Day : Friday Date: 11/29/2002

Time: 10:04:24

# . \* PALM INTRANET

## **Inventor Information for 09/913351**

Inventor Name	City	State/Country
DELGADO, AURORA BRIEVA	MADRID	SPAIN
VILLARRUBIA, VICENTE GARCIA	LAS ROZAS	SPAIN
GOMEZ-PAMO, ANTONIO GUERRERO	MADRID	SPAIN
RANIERI, JUAN PABLO PIVEL	MADRID	SPAIN
GALLEGO, GUILLERMO GIMENEZ	MADRID	SPAIN
TUDURI, JOSE ANTONIO MATJI	MADRID	SPAIN
Applin Info Contents Petition Info Att	y/Agentinfo Conti	nulty Data Foreign

Search Another: Application#	Search or Patent# Search
PCT //	Search Search
Attorney Docket #	Search
Bar Code #	Search/

To go back use Back button on your browser toolbar.

Back to PALM ASSIGNMENT OASIS Home page

h ecgbe ef

• \* PALM INTRANET

Day: Friday Date: 11/29/2002

Time: 10:04:28

## **Inventor Name Search Result**

Your Search was:

Last Name = TUDURI

First Name = JOSE

Application#	Patent#	Status	Date Filed	Title	Inventor Name
09913351	Not Issued	030		PHARMACOLOGICALLY ACTIVE POLYPEPTIDE GLYCOCONJUGATES	TUDURI, JOSE ANTONIO MATJI

Inventor Search Completed: No Records to Display.

Last Name

**First Name** 

Search Another: Inventor

TUDURI

JOSE

Search

To go back use Back button on your browser toolbar.

# • \* PALM INTRANET

Day: Friday Date: 11/29/2002

Time: 10:04:38

## **Inventor Name Search Result**

Your Search was:

Last Name = GALLEGO First Name = GUILLERMO

Application#	Patent#	Status	Date Filed	Title	Inventor Name
09881024	Not Issued	030			GALLEGO, GUILLERMO
<u>09767730</u>	Not Issued	030		APPARATUS AND METHOD OF PROVIDING BUSINESS SOLUTIONS AND SERVICES	GALLEGO, GUILLERMO
09913351	Not Issued	030		ACTIVE POLYPEPTIDE	GALLEGO, GUILLERMO GIMENEZ

Inventor Search Completed: No Records to Display.

**Last Name** 

First Name

Search Another: Inventor

**GALLEGO** 

GUILLERMO



To go back use Back button on your browser toolbar.

<u> PALM INTRANET</u>

Day: Friday Date: 11/29/2002

Time: 10:05:01

## **Inventor Name Search Result**

Your Search was:

Last Name = RANIERI First Name = JUAN

Application#	Patent#	Status	Date Filed	Title	Inventor Name
07873392	Not Issued	161	04/24/1992	PROCESS FOR THE OBTAINING OF POLYMERS WITH ACTIVITY ON THE HEMATOPOIETIC SYSTEM	RANIERI , JUAN P. P.
07973158	5324652	250	11/06/1992	PREPARATION OF PEPSIN SUBSTANTIALLY DEVOID OF PROTEOLYTIC ACTIVITY USING DIALYSIS	RANIERI , JUAN P. P.
<u>07806645</u>	5243036	150	12/13/1991	PROCESS FOR OBTAINING POLYMERS WITH ANTIVIRAL ACTIVITY	RANIERI , JUAN P.P.
07806669	5252728	150	12/13/1991		RANIERI , JUAN P.P.
09913351	Not Issued	030	08/13/2001	PHARMACOLOGICALLY ACTIVE POLYPEPTIDE GLYCOCONJUGATES	RANIERI, JUAN PABLO PIVEL
10251914	Not Issued	019	09/20/2002	P-HYDROXYPHENYL PROPIONIC ACID DERIVATIVES AS ANTIPROLIFERATIVE AGENTS	RANIERI, JUAN PABLO PIVEL

Inventor Search Completed: No Records to Display.

Search Another: Inventor RANIERI JUAN Search

To go back use Back button on your browser toolbar.

Back to PALM | ASSIGNMENT | OASIS | Home page

h e cg b e f

. \* PALM INTRANET

Day: Friday Date: 11/29/2002

Time: 10:05:09

## **Inventor Name Search Result**

Your Search was:

Last Name = GOMEZ-PAMO

First Name = ANTONIO

Application#	Patent#	Status	Date Filed	Title	Inventor Name
07806669	5252728	150		PROCESS FOR OBTAINING POLYMERS WITH ANTIVIRAL ACTIVITY	GOMEZ-PAMO , ANTONIO F. G.
07806645	5243036	150			GOMEZ-PAMO , ANTONIO F.G.
07973158	5324652	250	11/06/1992		GOMEZ-PAMO , ANTONIO G.
09913351	Not Issued	030	08/13/2001	PHARMACOLOGICALLY ACTIVE POLYPEPTIDE GLYCOCONJUGATES	GOMEZ-PAMO, ANTONIO GUERRERO

Inventor Search Completed: No Records to Display.

Search Another: Inventor GOMEZ-PAMO ANTONIO Search

To go back use Back button on your browser toolbar.

. \* PALM INTRANET

Day : Friday Date: 11/29/2002

Time: 10:05:15

## **Inventor Name Search Result**

Your Search was:

Last Name = VILLARRUBIA

First Name = VICENTE

Application#	Patent#	Status	Date Filed	Title	Inventor Name
09913351	Not Issued	030		PHARMACOLOGICALLY ACTIVE POLYPEPTIDE GLYCOCONJUGATES	VILLARRUBIA, VICENTE GARCIA

Inventor Search Completed: No Records to Display.

**Last Name** 

First Name

Search Another: Inventor

VILLARRUBIA

VICENTE

Seerich

To go back use Back button on your browser toolbar.



## **PALM INTRANET**

Day: Friday Date: 11/29/2002

Time: 10:05:22

## **Inventor Name Search Result**

Your Search was:

Last Name = DELGADO First Name = AURORA

Application#	Patent#	Status	Date Filed	Title	Inventor Name
07973158	5324652	250	11/06/1992	PREPARATION OF PEPSIN SUBSTANTIALLY DEVOID OF PROTEOLYTIC ACTIVITY USING DIALYSIS	DELGADO , AURORA B.
09913351	Not Issued	030	08/13/2001	PHARMACOLOGICALLY ACTIVE POLYPEPTIDE GLYCOCONJUGATES	DELGADO, AURORA BRIEVA

Inventor Search Completed: No Records to Display.

Search Another: Inventor DELGADO AURORA Search

To go back use Back button on your browser toolbar.

. \* PALM INTRANET

Day: Friday Date: 11/29/2002

Time: 10:04:18

# **Continuity Information for 09/913351**

Parent Data

09913351

is a national stage entry of PCT/ES99/00338 International Filing Date: 10/21/1999

**Child Data No Child Data** 

Applin Info Contents Petition Info Atty/Ago	entilato Data  Continuity Data  Data
Search Another: Application#	or Patent# Search
PCT / Search	or PG PUBS # Search
Attorney Docket #	Search

To go back use Back button on your browser toolbar.

## WEST

**Generate Collection** 

Print

## Search Results - Record(s) 1 through 6 of 6 returned.

☑ 1. Document ID: EP 1163911 A1

L9: Entry 1 of 6

File: EPAB

Dec 19, 2001

PUB-NO: EP001163911A1

DOCUMENT-IDENTIFIER: EP 1163911 A1

TITLE: GLYCOCONJUGATES OBTAINED FROM CANDIDA UTILIS CELLS AND RICINUS COMMUNIS SEEDS

Full Title Citation Front Review Classification Date Reference Sequences Attachments

KWIC Draw Desc Image

2. Document ID: WO 9814600 A1

L9: Entry 2 of 6

File: EPAB

Apr 9, 1998

PUB-NO: WO009814600A1

DOCUMENT-IDENTIFIER: WO 9814600 A1

TITLE: CANDIDA UTILIS TRANSFORMATION SYSTEM

Full Title Citation Front Review Classification Date Reference Sequences Attachments

KWMC Draws Desc Image

# 3. Document ID: WO 200050087 A1 CN 1344169 A AU 9964777 A EP 1163911 A1 BR 9917150 A ES 2163966 A1 KR 2001112290 A

L9: Entry 3 of 6

File: DWPI

Aug 31, 2000

DERWENT-ACC-NO: 2000-558369

DERWENT-WEEK: 200249

COPYRIGHT 2002 DERWENT INFORMATION LTD

TITLE: New glycoconjugate, useful for treating immunological disorders, comprises polysaccharide from <a href="Candida">Candida</a> utilis and polypeptide from Ricinus communis

Full Title Citation Front Review Classification Date Reference Sequences Attachments

1000C Draw Desc Image

# 4. Document ID: WO 9814600 A1 AU 744698 B AU 9745485 A EP 956356 A1 CN 1237208 A BR 9713313 A JP 2001501475 W

L9: Entry 4 of 6

File: DWPI

Apr 9, 1998

DERWENT-ACC-NO: 1998-240099

DERWENT-WEEK: 200228

COPYRIGHT 2002 DERWENT INFORMATION LTD

TITLE: New  $\underline{\text{Candida}}$  utilis auxotrophic mutants and DNA markers - useful in transformation systems to allow selection of transformants, e.g. for heterologous protein production

Full Title Citation Front Review Classification Date Reference Sequences Attachments

KilliC | Drawl Desc | Image

## 5. Document ID: EP 678516 A1 JP 3043003 B2 CA 2147594 A JP 08092171 A JP 2875969 B2 JP 11193278 A CA 2147594 C

L9: Entry 5 of 6

File: DWPI

Oct 25, 1995

DERWENT-ACC-NO: 1995-360051

DERWENT-WEEK: 200029

COPYRIGHT 2002 DERWENT INFORMATION LTD

TITLE: Prodn. of 1-(5-bromo-furyl-2)-2-bromo-2-nitro-ethane - which is useful as a

microbicide, by bromination of 1-(fur-2-yl)-2-nitro-ethane

Full Title Citation Front Review Classification Date Reference Sequences Attachments

KMC Draw Desc Image

## 6. Document ID: EP 491114 A1 DE 69107815 E EP 491114 B1 ES 2027518 A6 JP 05262661 A

L9: Entry 6 of 6

File: DWPI

Jun 24, 1992

DERWENT-ACC-NO: 1992-209356

DERWENT-WEEK: 199226

COPYRIGHT 2002 DERWENT INFORMATION LTD

TITLE: New non-covalent polysaccharide-protein associates - prepd. from seeds, grains or nuts and yeasts or extracts, have immuno-modulating or haematopoietic restoring activity

Full Title Citation Front Review Classification Date Reference Sequences Attachments

KMC Praw Desc Image

Generate Collection

Print

Terms	Documents
((delgado)[IN] or (villarrubia)[IN] or (gomez-pamo)[in] or	
(ranieri)[in]) and candida	0

**Display Format:** -

- Change Format

**Previous Page** 

Next Page

100	
$V_{\Lambda}V/$	
<b>1/1/</b>	

Generate Collection

Print

## Search Results - Record(s) 1 through 2 of 2 returned.

1. Document ID: EP 1163911 A1

L6: Entry 1 of 2

File: EPAB

Dec 19, 2001

PUB-NO: EP001163911A1

DOCUMENT-IDENTIFIER: EP 1163911 A1

TITLE: GLYCOCONJUGATES OBTAINED FROM CANDIDA UTILIS CELLS AND RICINUS COMMUNIS SEEDS

Full Title Citation Front Review Classification Date Reference Sequences Attachments

KWC Draw Desc Image

2. Document ID: WO 200050087 A1 CN 1344169 A AU 9964777 A EP 1163911 A1 BR 9917150 A ES 2163966 A1 KR 2001112290 A

L6: Entry 2 of 2

File: DWPI

Aug 31, 2000

DERWENT-ACC-NO: 2000-558369

DERWENT-WEEK: 200249

COPYRIGHT 2002 DERWENT INFORMATION LTD

TITLE: New glycoconjugate, useful for treating immunological disorders, comprises

polysaccharide from Candida utilis and polypeptide from Ricinus communis

Full   Title   Citation   Front   Rev	ем Classification Date Reference Sequences А	ttachments.	KMMC   Drawn Desc   Image
	Generate Collection	Print	
	Terms	Accordance of the second	Documents
(dalgada)[INI] and	l (villarrubia)[IN]	***************************************	2

Display Format: - Change Format

Previous Page

Next Page

```
DATE: Friday, November 29, 2002 Printable Copy Create Case
Set Name
side by side
      Query
                                                  Hit Count
                                                        Set Name
                                                         result set
   DB=USPT,PGPB,JPAB,EPAB,DWPI,TDBD; PLUR=YES; OP=OR
  L8
      ((delgado)[IN] or (villarrubia)[IN] or (gomez-pamo)[in] or (ranieri)[in]) and candida
                                                          L8
  L7
      (delgado)[IN] or (villarrubia)[IN] or (gomez-pamo)[in] or (ranieri)[in]
                                                     803
                                                          L7
  L6
      (delgado)[IN] or (villarrubia)[IN] or (gomez-pamo)[in]
                                                     690
                                                          L6
  L5
      (delgado)[IN] and (villarrubia)[IN]
                                                       2
                                                          L5
  L4
      (delgado)[IN]
                                                     648
```

L4

PCT ORGANIZACION MUNDIAL DE LA PROPIEDAD INTELECTUAL
Oficina Internacional
SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACION EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(51) Clasificación Internacional de Patentes 7:

A61K 47/48, C07K 14/415

(11) Número de publicación internacional:

WO 00/50087

A1

(43) Fecha de publicación internacional:

31 de Agosto de 2000 (31.08.00)

(21) Solicitud internacional:

PCT/ES99/00338

(22) Fecha de la presentación internacional:

21 de Octubre de 1999 (21.10.99)

(30) Datos relativos a la prioridad:

P 9900408

26 de Febrero de 1999 (26.02.99)

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US): INDUSTRIAL FARMACEUTICA CANTABRIA, S.A. [ES/ES]; Carretera de Cazoña-Adarzo, E-39011 Santander (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/solicitantes (sólo US): BRIEVA DELGADO, Aurora [ES/ES]; Josefa Valcarcel, 12, Chalet 10, E-28027 Madrid (ES). GARCIA VILLARRUBIA, Vicente [ES/ES]; Cornisa, 11, Residencial La Cornisa, Bloque G 1º A, E-28230 Las Rozas (ES). GUERRERO GOMEZ-PAMO, Antonio [ES/ES]; Plaza Reyes Magos, 13-9° D, E-28007 Madrid (ES). PIVEL RANIERI, Juan Pablo [ES/ES]; Antonio Arias, 12-6° A, E-28009 Madrid (ES). GIMENEZ GALLEGO, Guillermo [ES/ES]; Pablo Aranda, 3, E-28006 Madrid (ES). MATJI TUDURI, Jose Antonio [ES/ES]; Serramagna, 8, E-28043 Madrid (ES).

(74) Mandatario: GARCIA-CABRERIZO Y DEL SANTO, Pedro María; Vitruvio, 23, E-28006 Madrid (ES).

(81) Estados designados: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, Patente ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Patente euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Patente europea (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), Patente OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Publicada** 

Con informe de búsqueda internacional.

- (54) Title: GLYCOCONJUGATES OBTAINED FROM CANDIDA UTILIS CELLS AND RICINUS COMMUNIS SEEDS
- (54) Título: GLICOCONJUGADOS OBTENIDOS A PARTIR DE CELULAS DE CANDIDA UTILIS Y DE SEMILLAS DE RICINUS **COMMUNIS**

### (57) Abstract

The invention relates to glycopeptidic glycoconjugates, in which the polysaccharide is obtained from Candida utilis cells and the peptides from Ricinus communis seeds. Said glycoconjugates are used in the preparation of immunomodulating drugs controlling the production of tumoral necrosis factor (TNF).

### (57) Resumen

Glicoconjugados de naturaleza glicopeptídica, en los que el polisacárido se obtiene a partir de células de Candida utilis y los péptidos a partir de semillas de Ricinus communis. Dichos glicoconjugados se utilizan para preparar fármacos immunomoduladores que controlan la producción del Factor de Necrosis Tumoral (TNF).

## UNICAMENTE PARA INFORMACION

Códigos utilizados para identificar a los Estados parte en el PCT en las páginas de portada de los folletos en los cuales se publican las solicitudes internacionales en el marco del PCT.

l	AL	Albania	ES	España	LS	Lesotho	SI	Eslovenia
1	AM	Armenia	FI	Finlandia	LT	Lituania	SK	Eslovaquia
I	AT	Austria	FR	Francia	LU	Luxemburgo	SN	Senegal
I	AU	Australia	GA	Gabón	LV	Letonia	SZ	Swazilandia
ł	A.Z.	Azerbaiyán	GB	Reino Unido	MC	Mónaco	TD	Chad
١	BA	Bosnia y Herzegovina	GE	Georgia	MD	República de Moldova	TG	Togo
١	ВВ	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tayikistán
1	BE	Bélgica	GN	Guinea	MK	Ex República Yugoslava de	TM	Turkmenistán
1	BF	Burkina Faso	GR	Grecia		Macedonia	TR	Turquía
ı	BG	Bulgaria	HU	Hungria	ML	Malí	TT	Trinidad y Tabago
1	ВJ	Benin	IE	Irlanda	MN	Mongolia	UA	Ucrania
1	BR	Brasil	IL	Israel	MR	Mauritania	UG	Uganda
	BY	Belarús	IS	Islandia	MW	Malawi	US	Estados Unidos de América
	CA	Canadá	IT	Italia	MX	México	UZ	Uzbekistán
1	CF	República Centroafricana	JP	Japón	NE	Níger	VN	Viet Nam
	CG	Congo	KB	Кепуа	NL	Países Bajos	YU	Yugoslavia
	СН	Suiza	KG	Kirguistán	NO	Noruega	zw	Zimbabwe
	CI	Côte d'Ivoire	KP	República Popular	NZ	Nueva Zelandia		
1	СМ	Camerún		Democrática de Corea	PL	Polonia		
	CN	China	KR	República de Corea	PT	Portugal		
	CU	Cuba	KZ	Kazakstán	RO	Rumania		
	cz	República Checa	LC	Santa Lucía	RU	Federación de Rusia		
	DE	Alemania	IJ	Liechtenstein	SD	Sudán		
	DK	Dinamarca	LK	Sri Lanka	SE	Succia		
	EE	Estonia	LR	Liberia	SG	Singapur		
	1							

1

GLICOCONJUGADOS OBTENIDOS A PARTIR DE CELULAS DE CANDIDA UTILIS Y DE SEMILLAS DE RICINUS COMMUNIS

### DESCRIPCION

5 El conocimiento creciente en relación a los mecanismos de funcionamiento y regulación del sistema inmunológico ha planteado en los últimos años la posibilidad de modular terapéuticamente su funcionalidad.

La gran diversidad de sustancias de distinto origen, natural y sintético, capaces de modular algún mecanismo inmunológico se debe, en parte a la enorme posibilidad de reconocimiento de sustancias ajenas al organismo que le es propio. En (GH Werner, P Follés "Immunostimulating agents: what next?. A review of their present and potential medical applications." Eur. J. Biochem 242, 1-19 (1996)) se describen alguno de los productos de desarrollo recientes así como sus posibles implicaciones terapéuticas.

De entre los mediadores endógenos uno cuyo control plantea uno de los desafíos terapéuticos más importantes es el factor de necrosis tumoral (TNF). Esta molécula presenta unas características diferenciadas especiales (R Ksontini, SLD MacKay, LL Moldawer "Revisiting the role of tumor necrosis factor á and the response to surgical injury and inflammation" Arch. Surg. 133, 558-567 (1998). JL Alonso "La compleja fisiología del factor de necrosis tumoral." Inmunología 8, (3) 73-94 (1989). T. Calandra "Importance des cytokines dans les syndromes septiques." Med. Hyg. 49, 609-614 (1991). A Eigler, B Sinha, G Hartman, S Endres "Taming TNF: strategies to restrain this pro inflammatory cytokines." Immunology Today 18,487-492 (1997). R González-Amaro, C García-Monzón, L García-Buey, R Moreno-Otero, JL Alonso, E Yagüe, JP Pivel, M López-Cabrera, E Fernández-Ruiz, F Sánchez-Madrid "Induction of Tumor Necrosis Factor á Production by Human Hepatocytes in Chronic Viral Hepatitis." J. Exp. Med 179, 841-848 (1994).):

El factor de necrosis tumoral (TNF) es una citoquina pleiotrópica, dado el gran número de células que responden a ella. Producida normalmente por monocitos, presenta dos formas activas, una ligada a la membrana de la célula secretora, y otra libre, consecuencia del procesamiento de la anterior por una metaloproteinasa, la enzima convertidora del factor de necrosis tumoral o TACE.

Asímismo también está documentada la participación de otras

células distintas de monocitos en la síntesis de TNFá, tales como linfocitos T. (AG Santis, MR Campanero, JL Alonso, F Sánchez-Madrid "Regulation of tumor necrosis factor (TNF)-á synthesis and TNF receptors expression in T lymphocytes through the CD2 activation pathway." Eur. J. Immunol. 22, 3155-3160 (1992). AG Santis, MR Campanero, JL Alonso, A Tugores, MA Alonso, E Yagüe, JP Pivel, F Sánchez-Madrid "Tumor necrosis factor-á production induced in T lymphocytes through the AlM/CD69 activation pathway." Eur. J. Immunol 22,1253-1259 (1992).) y células NK (I Melero, MA Balboa, JL Alonso, E Yagüe, JP Pivel, F Sánchez-Madrid, M Lopez-Botet "Signaling through the LFA-1 leucyte integrin actively regulates intercellular adhesion and tumor necrosis factor-á production in natural killer cells." Eur. J. Immunol. 23,1859-1865 (1993).).

Existen un número de moléculas que inducen la producción de TNF tales como la endotoxina bacteriana o lipopolisacárido (LPS), superantigenos de origen bacteriano, viral o de células superiores, e incluso otras titoquinas.

El TNF, similarmente a otras citoquinas, actúa de una manera no enzimática, a concentraciones en el orden nano a femtomolar, tanto a nivel de la propia célula secretora (actividad autocrina) como sobre células adyacentes (actividad yuxtacrina) como sobre tejidos vecinos (actividad paracrina) o distantes (actividad endocrina). Esto supone que la actividad de esta molécula, al igual que la de otras citoquinas, está muy influenciada por el "status" de la célula receptora y por su interacción, entre otras, con la matriz extracelular.

Así, en distintas situaciones se ha encontrado que el TNF circulante no es siempre el parámetro fundamental, pues si bien éste puede ser normal, pueden haber niveles locales muy elevados de esta citoquina.

Se han descrito, en distintos tipos celulares, dos receptores, denominados receptores de TNF p55 (TNFR p55) y p 75 (TNFR p75).

La interacción de estos receptores con el TNF libre o el ligado da lugar a un espectro variado de respuestas, que se pueden englobar en tres grandes grupos:

Por un lado la activación de la cascada inflamatoria, dado que TNF pertenece a un grupo de proteínas relacionadas con ésta, entre las que están IL1, IL6, GM-CSF, etc. Por otro lado, la activación de la respuesta de mediación celular frente a la agresión patogénica, especialmente por patógenos intracelulares. Y, por un tercero, la apoptosis, o muerte celular programada, manifestada especialmente en células tumorales. Sin embargo, en respuesta apoptótica, TNF manifiesta una

3

respuesta dual, ya que por un lado, la activación por TNF del factor de transcripción NFkB puede proteger a algunas poblaciones celulares de la muerte durante una infección aguda, pero, sin embargo, la hiperproducción de TNF puede llevar a muerte por apoptosis. Como consecuencia de lo anterior, TNF se 5 ve implicado en distintas patologías. La relación entre su superproducción, local v/o sistémica, y el desencadenamiento y mala evolución de muchos procesos patológicos está ampliamente documentada (R Ksontini, SLD MacKay, LL Moldawer "Revisiting the role of tumor necrosis factor á and the response to surgical injury and inflammation" Arch. Surg. 133, 558-567 (1998). JL Alonso "La 10 compleja fisiología del factor de necrosis tumoral." Inmunología 8, (3) 73-94 (1989). T. Calandra "Importance des cytokines dans les syndromes septiques." Med. Hyg. 49, 609-614 (1991). A Eigler, B Sinha, G Hartman, S Endres "Taming TNF: strategies to restrain this pro inflammatory cytokines." Immunology Today 18,487-492 (1997). R González-Amaro, C García-Monzón, L García-Buey, R 15 Moreno-Otero, JL Alonso, E Yagüe, JP Pivel, M López-Cabrera, E Fernández-Ruiz, F Sánchez-Madrid "Induction of Tumor Necrosis Factor á Production by Human Hepatocytes in Chronic Viral Hepatitis." J. Exp. Med 179, 841-848 (1994).). La producción de TNF por distintos tipos celulares contribuye además al papel que tiene esta citoquina en el desarrollo de variadas situaciones 20 patológicas que incluyen por ejemplo lesiones en piel y en intestino, asociadas a la reacción injerto huésped (PF Piquet, GE Grau, B Allet, P Vassalli. "Tumor Necrosis Factor/Cachectin is an effector of skin and gut lesions of the acute phase of GRAFT-VS-HOST disease." J.Exp. Med. 166,1280-1289 (1987).), la pneumocistosis (CE Reed. "Hypersensitivity pneumonitis and occupational lung 25 disease from inhaled endotoxin."Immunology and Allergy Clinics of North America. 12 Nº 4(1992)) o patologías neurológicas (SW Barger "Tumor Necrosis Factor. The Good, the Bad and the Umbra." Neuroprotective Signal Transduction. Edited by M.P.Mattson Humana Press Inc. Totowa NJ.), patologías pulmonares, patologías crónicas (como enfermedad inflamatoria intestinal y artritis 30 reumatoide) y sepsis. Esta citoquina presenta también un papel muy importante en dos patologías de gran incidencia: asma y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (P. Norman "Pulmonary diseases. Disease trends and market opportunities" Financial Times Pharmaceuticals Management Reports (1999)).

Todos estos antecedentes plantean la dificultad del diseño de 35 terapias efectivas basadas en el control del TNF en distintas situaciones

4

patológicas.

El diseño de nuevos fármacos exige el establecimiento y puesta a punto de modelos farmacológicos experimentales que reproduzcan los aspectos más importantes de la patología en cuestión. Uno de los modelos más empleados en la búsqueda de fármacos capaces de controlar la producción de TNF es el modelo murino de inducción sistémica de TNF por endotoxina bacteriana (LPS). Otros modelos ampliamente usados son aquellos en los que se estudia la estimulación *in vitro* de células pertenecientes al linaje granulocitomacrófago para la producción de dicha citoquina.

Uno de los aspectos más llamativos desde el punto de vista 10 científico es la gran diversidad química de productos a los que se les adjudica la capacidad de controlar la hiperproducción de TNF en distintos modelos experimentales in vivo e in vitro. Entre ellos se pueden mencionar antioxidantes (N Satomi, A Sakurai, R Haranaka, K Haranaka. "Preventive Effects of Several 15 Chemicals Against Lethality of Recombinant Human Tumor Necrosis Factor." Journal of Biological Response Modifiers. 7,54-64 (1988).), cannabioides (R Gallily, A Yamin, Y Waksmann, H Ovadia, J Weidenfeld, A Bar-Joseph, A Biegon, R Mechoulanm, E Shohami. "Protection against Septic Shock and Suppression of Tumor Necrosis Factor á and Nitric Oxide Production by 20 Dexanabinol (HU-211), a Nonpsychotropic Cannabinoid." The Journal of Pharmacol. and Experimental Therapeut. 283, 918-924 (1997).), IL10 (SR Smith, C Terminelli, G Denhardt, S Narula, G Jeanette Thorbecke "Administration of Interleukin-10 and the Time of Priming Protects Corynebacterium parvum-Primed Mice against LPS- and TNF-á-Induced Lethality." Cellular Immunology 173, 207-25 214 (1996).), Thalidomida (AL Moreira, J Wang, EN Sarno, G Kaplan. "Thalidomide protects mice against LPS-induced shock." Brazilian Journal of Medical and Biological Research 30: 1199-1207 (1997). SM McHugh, TL Rowland "Thalidomide and derivatives: immunological investigations of tumour necrosis factor-alpha (TNF-á) inhibition suggest drugs capable of selective gene 30 regulation." Clin Exp. Immunol 110: 151-154 (1997). JD Klausner, VH Freedman, G Kaplan "Thalidomide as an Anti-TNF-á Inhibitor: Implications for Clinical Use." Clinical **Immunology** Immunopathology. 81, 219-223 and (1996).)Chlorpromacina (M.Gadina, R. Bertini, M. Mengozzi, M. Zandalasini, A. Mantovani and P. Ghezzi. "Protective Effect of Chlorpromazine on Endotoxin 35 Toxicity and TNF Production in Glucocorticoid-Sensitive and Glucocorticoid-

5

Resistant Models of Endotoxic Shock." J.Exp. Med. 273,1305-1310 (1991).), Benzydamina (A. Guglielmotti, L. Aquilini, M.T. Rosignoli, C. Landolfi, L. Soldo, I. Coletta and M. Pinza "Benzydamine protection in a mouse model of 46,332-335 (1997).)hidrazinsulfato endotoxemia." Inflamm. Resp. 5 (R.Silverstein, B.R. Turley, C.A. Christoffersen, D.C.Johnson and D.C.Morrison "Hydrazine Sulfate Protects D-Galactosamine-sensitized Mice against Endotoxin and Tumor Necrosis factor/Cachectin Lethality: Evidence of a Role for the Pituitary." J.Exp. Med. 173, 357-365 (1991).) y extractos naturales (H.Ueda and M. Yanazaki "Inhibition of Tumor Necrosis Factor-á Production by Orally 10 Administering a Perilla Leaf Extract." Biosci. Biotech. Biochem. 61,1292-1295 (1997).).

Asimismo, en el estudio de situaciones clínicas en pacientes con patologías en las que se sabe que el TNF juega un papel en relación a su evolución se ha estudiado el efecto de distintos principios activos en la 15 regulación de la producción de TNF, in vitro, por parte de monocitos aislados de sangre periférica. Entre ellos podemos mencionar ciplofloxacina (S Bailly, M Fay, B Ferrua, MA Gougerot-Pocidalo "Ciprofloxacin treatment in vivo increases the ex vivo capacity of lipopolysaccharide-stimulated human monocytes to produce IL-1, IL-6 and tumour necrosis factor-alpha." Clin. Exp. Immunol. 85, 331-334 (1991).), 20 rolipram (J Semmler, H Wachtel, S Endres "The specific type IV phosphodiesterase inhibitor rolipram suppresses Tumor Necrosis Factor-á production by human mononuclear cells." Int. J. Immunopharmac. 15,409-413 (1993).), vesnarinona (T Kambayashi, N Mazurek, ChO Jacob, N Wei, M Fond and G Strassmann. "Vesnarinone os a selective inhibitor of Macrophage TNF-á 25 release." Int. J. Immunopharmac. 18,371-378 (1996).), análogos de prostaciclinas (A Jörres, H Dinter, N Topley, GM Gahl, U Frei, P Scholz. "Inhibition of Tumour Necrosis Factor production in endotoxin-stimulated human mononuclear leukocytes by the prostacyclin analogue iloprost: Cellular Mechanisms." Cytokine 9,119-125 (1997).), pentoxifilina (BJ Dezube, ML Sherman, JL Fridovich-Keil, J 30 Allen-TiRyan, A B Pardee. "Down-regulation of tumor necrosis factor expression by pentoxifylline in cancer patients: a pilot study." Cancer Immunol Immunother 36: 57-60 (1993).). Un caso especial es la mención mención de los corticoides en función de su conocida relación de inhibición del gen TNF (S Abe, T Yamamoto, S lihara, M Yamazaki, D Mizuno. "A possible role of glucocorticoids: an intrinsic 35 inhibitor of the cytotoxic activity of Tumor Necrosis Factor." Jpn. J. Cancer Res. 6

(Gann) 79: 305-308 (1988). J Han, P Thompson, B. Beutler "Dexamethasone and Pentoxifylline Inhibit Endotoxin-induced Cachectin/Tumor Necrosis Factor Synthesis at Separate Points in the Segnaling Pathway." J. Exp. Med. 172, 391-394 (1990). JMH Debets, TJM Ruers, MPMH Van Der Linden, CJ Van den 5 Linder, WA Buurman. "Inhibitory effect of corticosteroids on the secretion of tumour necrosis factor (TNF) by monocytes is dependent on the stimulus inducing TNF synthesis." Clin Exp. Immunol. 78: 224-229 (1989).). Merece ser destacado que la modulación de niveles de citoquinas se menciona ya como una "diana" específica en el diseño de nuevos fármacos (K Cooper, H Masamune 10 "Cytokine Modulation as a Medicinal Chemistry Target." Annual Reports in Medicinal Chemistry- 27, Chapter 22.). Otros intentos de controlar los efectos de esta citoquina, tanto en situación de sepsis como de colitis ulcerosa y de artritis reumatoide, tiene relación con el desarrollo de anticuerpos monoclonales anti TNF (A Trilla, P Alonso "Anticuerpos monoclonales en el tratamiento del shock 15 séptico." Med. Clin. 99: 778-780 (1992). JG Sinkovics "Monoclonal antibodies in the treatment of endotoxin shock" Acta Microbiologica Hungarica 37: (1990).SB Porter "Current Status of Clinical Trials With Anti-TNF" Chest 112: 6 (1997). JR O'Dell "Anticytokine therapy. A new era in the treatment of rheumatoid arthritis" New Eng. J. Med. 340, 310-312 (1999). RA van Hogenzand, HW Verspaget "The 20 future role of anti-tumor necrosis factor á products in the treatment of Crohn's disease" Drugs 56, 299-305 (1998). F Mackay, JL Browning, P Lawton, SA Shah, M Comiskey, AK Bhan, E Mizoguchi, C Terhorst, SJ Simpson "Both the lymphotoxin and tumor necrosis factor pathways are involved in experimental murine models of colitis" Gastroenterology 115, 1464-1475 (1998)). Sin embargo, 25 y a pesar del amplio conocimiento acerca de esta citoquina, incluyendo su biología molecular esto no ha permitido el desarrollo de agentes terapéuticos eficaces y seguros en el control de su hiperproducción.

Un análisis crítico de todas estas posibles opciones terapéuticas indica que, por ejemplo en el caso de los monoclonales anti TNF, éstos no han resultado eficaces en el caso de patologías agudas y presentan gran variabilidad en su afinidad por la citoquina, aunque últimamente se han reportado casos exitosos en el caso de artritis reumatoide y de colitis ulcerosa (JR O'Dell "Anticytokine therapy. A new era in the treatment of rheumatoid arthritis" New Eng. J. Med. 340, 310-312 (1999). RA van Hogenzand, HW Verspaget "The future role of anti-tumor necrosis factor á products in the treatment of Crohn's

7

disease" Drugs 56, 299-305 (1998).); otros productos presentan un perfil de toxicidad muy fuerte, como el caso de la Thalidomida, o presentan una actividad principal que los hace de difícil manejo como ciprofloxacina o Rolipram. En otros casos hay ausencia de definición química, y por ende de reproducibilidad lote a lote, como los extractos. Finalmente, en el caso de los corticoides, inhibidores de la expresión del gen TNF, presentan un conjunto importante de contraindicaciones.

El conocimiento de los mecanismo funcionales del sistema immune ha permitido en los últimos años el desarrollo de sustancias conocidas como inmunomoduladores. Existen situaciones patológicas en las que el recurso de los inmunomoduladores se hace especialmente importante, tales como enfermades autoinmunes, con el correspondiente desequilibrio del sistema inmune, inmunosupresión iatrogénica (como la producida en trasplantes, terapia antineoplásica o intervenciones quirúrgicas especialmente traumáticas) o medioambiental (producida por "stress" o por contaminación). Por otra parte, en muchos protocolos terapéuticos hoy se incluyen inmunomoduladores como adyuvantes a la terapia específica antioncogénica o antiinfecciosa (E Garaci, F Pica, G Rasi, AT Palamara, C Favalli "Combination therapy with BRMs in cancer and infectious diseases" Mechanisms of Ageing and Development 96, 103-116 (1997).

Dentro de los inmunomoduladores constituye un importante grupo aquellos diseñados con el objetivo de estimular mecanismos de inmunidad natural, en particular la actividad NK o las actividades fagocitarias y microbicidas del sistema mononuclear fagocítico. Entre ello se puede mencionar extractos bacterianos, BCG, Corynebacterium parvum, derivados del muramildipéptido, así como polisacáridos, especialmente glucanos extraídos de levaduras (A Aszalos "Immunstimulators of microbial origin" en "Antitumor compounds of natural origin" CRC Press (1982)). Si bien las moléculas anteriormente descritas han demostrado su efectividad como activadores del sistema monocito-macrófago, así como una cierta eficacia como antitumorales, su administración conlleva dos efectos secundarios indeseados: Por un lado producen un bloqueo de los sistemas de metabolización hepáticos -propiedad que comparten con otras sustancias inmunomoduladores y que dificultan su administración adyuvante con otras terapias, como antibióticos o citostáticos- y por otro, y muy especialmente, susceptibilizan a endotoxina bacteriana, pudiéndose dar el caso de que la

8

endotoxina liberada por la acción antibiótica sea más tóxica para el paciente en presencia del adyuvante inmunológico (M Trautmann, R Zick, T Rukavina, AS Cross, R Marre "Antibiotic-induced release of endotoxin: *In vitro* comparison of meropenem and other antibiotics" J. Antimicr. Chemother. 41, 163-169 (1998)).

De lo antedicho se deduce que existe, por lo tanto, una estrecha ventana terapéutica consistente en encontrar productos capades de inhibir selectivamente algunas acciones del TNF sin bloquear, o más aún estimulando, la respuesta de inmunidad natural.

Dentro de los tipos de moléculas cuya utilización ha sido más 10 controvertida están los inmunomoduladores de tipo peptídico. La controversia se basa en que si bien este tipo de moléculas presentan actividades muy prometedoras, tales como interacción específica con receptores, inhibición específica de otras proteínas -como los inhibidores de proteasas-, etc, presentan problemas de biodisponibilidad, especialmente por vía oral, susceptibilidad a 15 proteasas, vida media corta y desencadenamiento de reacciones alérgicas o anafilácticas. Una revisión muy reciente de péptidos y proteínas como inmunoduladores destacan estas características (JE Talmadge "Pharmacodynamic aspects of peptide administration biological response modifiers" Advanced Drug Delivery Reviews 33, 241-252 (1998)): "Varios 20 paradigmas distinguen la actividad terapéutica de proteínas en comparación con los clásicos fármacos de bajo peso molecular. Estas diferencias están predominantemente asociadas con los atributos farmacodinámicos de las proteinas. Así, esto es crítico tanto para entender la farmacología de estos fármacos como para optimizar su actividad terapéutica, o más generalmente, 25 para identificarla. Estos paradigmas incluyen:

La corta vida media de las proteínas y el requerimiento de la administración subcutánea o por infusión continuada para obtener la máxima actividad.

La respuesta aparente en forma de campana.

5

35

La necesidad de una administración crónica asociada con el mecanismo percibido de acción de dichas moléculas.

La actividad óptima de dichos agentes como terapia adyuvante administrada en conjunción con quimio y/o radioterapia y que

La máxima actividad inmunoterapéutica adyuvante se encuentra en pacientes con enfermedad residual mínima."

El objeto de la presente invención es el hecho de que determinados

9

péptidos o proteínas, con características especiales físico-químicas, definidas por requisitos estructurales precisos, son capaces de formar conjugados no covalentes con determinadas moléculas de naturaleza polisacarídica, definidas por unas características estructurales tales que hacen posible la formación de dichos conjugados, y que estos conjugados presentan actividad por vía oral en la modulación de la respuesta inmune humana o animal. Esta modulación se traduce en la regulación a la baja de la producción de TNF inducido en determinadas condiciones experimentales, siendo asimismo capaces de estimular el sistema mononuclear - fagocítico, de expandir el compartimiento granulocito-macrófago y no presentando inhibición de los sistemas de metabolización hepáticos.

Es necesario destacar dos hechos que hacen particularmente importante el hecho objeto de la presente invención:

El primero es que los conjugados no covalentes formados son activos por vía 15 oral, constituyendo así una novedad en el campo de los péptidos biológicamente activos por dicha vía, y superando los inconvenientes de una manera original para dicha vía de administración. Estos inconvenientes quedan perfectamente descritos en los siguientes trabajos: BL Ferraiolo, LZ Benet "Peptides and proteins as drugs" Pharmaceutical Research 4, 151-194 (1985); FM Rollwagen, S 20 Bagar "Oral cytokine administration" Immunol. Today 17, 548-550 (1996); Solis-Pereyra, N Aattouri, D Lemonnier "Role of food in the stimulation of cytokine production" Am. J. Clin. Nutr. 66, 521S-525S (1997); A Fasano "Innovative strategies for the oral delivery of drugs and peptides" Trends in Biotech. 16, 152-157 (1998); GM Pauletti, S Gangwar, TJ Siahaan, J Aubé, RT Borchardt 25 "Improvement of oral peptide bioavailability: Peptidomimetics and prodrug strategies" Adv. Drug Deliv. Rev. 27, 235-256 (1997); JJ Hols, C Deacon, MB Toft-Nielsen, L Bierre-Knudsen "On the treatment of diabetes mellitus with Glucagon-like peptide-1" Ann. New York Acad. Sci. 865, 336-343 (1998)). En este sentido hay que destacar que éste no es el único ejemplo de actividad de 30 proteínas por vía oral (Y Nagao, K Yamashiro, N Hara, Y Horisawa, K Kato, A Uemura "Oral administration of IFN-á potentiates immune response in mice" J. Interferon and Cytokine Res. 18, 661-666 (1998); S Kaminogawa "Food allergy, oral tolerance and immunomodulation. Their molecular and cellular mechanisms" Biosci. Biotech. Biochem. 60, 1749-1756 (1996); H. Uwata, T-T Yip, K Yamauchi, 35 S Teraguchi, H Hayasawa, M Tomita, T.W. Hutchens "The survival of ingested lactoferrin in the gastrointestinal tract of adult mice" Biochem J. 334, 321-323 (1998); J Xu-Amano, WK Aicher, T Taguchi, H Kiyono, JR McGhee "Selective induction of Th2 cells in murine Peyer's patches by oral immunization" Internat. Immunol. 4, 433-445 (1992)).

5 El segundo es que están descritas complejos polisacárido-proteína, tanto covalentes como no covalentes, dotados de actividad biológica, pero que, a diferencia del objeto de la presente invención, se trata, en general, de asociaciones en las que la adición de determinados péptidos produce un respuesta antigénica de polisacáridos débilmente incremento en la 10 inmunogénicos, consiguiendo, gracias a la asociación, una respuesta T dependiente frente a un antígeno polisacaridico que solo es T independiente y de baja respuesta (H-K Guttormsen, LM Wetzler, RW Finberg, DL Kasper "Immunologic memory induced by a glycoconjugate vaccine in a murine adoptive lymphocyte transfer model" Infection and Immunity 66, 2026-2032 (1998); MA 15 Avanzini, AM Carrè, R Macario, M Zecca, G Zecca, A Pession, P Comoli, M Bozzola, A Prete, R Esposito, F Bonetti, F Locatelli "Immunization with Haemophilus influenzae type b conjugate vaccine in children given bone marrow transplantation: Comparison with healthy age-matched controls" J. Clin. Immunol. 18,193-301 (1998); EFE Babiker, A Hiroyuki, N Matsudomi, H Iwata, T Ogawa, N 20 Bando, A Kato "Effect of polysaccharide conjugation or transglutaminase treatment on the allergenecity and functional properties of soy protein" J. Agric. Food Chem. 46, 866-871 (1998)). Es de resaltar que, a diferencia de la presente invención, en los casos en los que se han descrito asociaciones polisacáridoproteína con actividad inmunomoduladora, estas asociaciones son covalentes y 25 proceden de la misma fuente natural (K Noda, N Ohno, K Tanaka, M Okuda, T Yadomae, K Nomoto, Y Shoyama "A new type of biological response modifier from Chlorella vulgaris which needs protein moiety to show antitumour activity" Phytotherapy Res. 12, 309-319 (1998); D Sabolovic, L Galoppin "Effect of a protein bound polysaccharide (PS-K on tumor development and infections in 30 splenectomized rats and mice" Int. J. Immunopharmac. 8, 41-46 (1986)).

Para facilitar la mejor comprensión de las características de la invención, se va a realizar una descripción detallada de la misma.

11

glicoconjugado.

Esta invención describe la formación y propiedades farmacológicas de conjugados de determinadas polipéptidos, sustancialmente puros, y determinados polisacáridos, sustancialmente puros, para la manufactura de composiciones terapéuticas para el tratamiento de disfunciones inmunologicas, de infecciones y/o de tumores. Dichos conjugados son farmacológicamente activos, mientras que ninguno de sus componentes (polipéptido o polisacárido) presentan las actividades farmacológicas de los conjugados. Asimismo, dichos conjugados presentan distintas estequiometrías en la relación polisacárido polipéptido, siendo las actividades farmacológicas dependientes de dichas estequiometrías.

La descripción técnica de la presente invención consta de la siguientes partes: a) requisitos que deben cumplir las moléculas de naturaleza polisacarídica objeto de la presente invención; b) requisitos que deben cumplir las moléculas de naturaleza polipeptídica objeto de la presente invención; c) consecuencias de dichos requisitos: formación de los conjugados polisacárido polipéptido; d) actividades biológicas de los conjugados polisacárido-polipéptido.

20 A) Requisitos que deben cumplir las moléculas de naturaleza polisacarídica objeto de la presente invención.

Las moléculas de naturaleza polisacarídica objeto de la presente invención deben cumplir los siguientes requisitos:

Su origen debe ser microbiano, no viral, y en especial originados en pared de levaduras. Su peso molecular promedio debe estar situado entre 50 y 250 Kda; estos polisacáridos deben ser solubles en agua o en medio salinos con fuerza iónica similar a la producida por soluciones de cloruro sódico de concentraciones comprendidas entre 0 y 250 mM, debiendo ser solubles en estas condiciones cuando menos a 0.1 mg/mL. En solución en medios neutros deben presentar carga negativa, fundamentalmente debida a grupos fosfato, que confieren una especial reactividad frente a células ãã T (A Salerno, F Dieli "Role of ãã T lymphocytes in immune response in humans and mice" Critical Rev. Immunol 18, 327-357 (1998)), con una relación de residuos fosfato por monosacárido entre 1 a 5 y 1 a 25; no deben presentar grupos sulfato ni carboxilato. En cuanto a su composición de monosacáridos, manosa debe ser el

principal (al menos el 40%), siendo los otros glucosa y/o galactosa; el contenido en monosacáridos nitrogenados no debe superar el 5 % del total. El esqueleto principal debe estar formado por enlaces 1-6 con ramificaciones preferiblemente 1-2, y de modo que los monosacáridos en las ramificaciones no superen el 60 %. No deben presentar grupos lipídicos asociados.

En cuanto a su comportamiento fisico-químico, deben presentar dominios capaces de interactuar con octadecilsilano en medio acuoso y no deben gelificar en medios acuosos o salinos, en particular en presencia de calcio a concentraciones inferiores o iguales a 2 mM. Deben ser capaces de formar conjugados con polipéptidos o péptidos con las características descritas en el apartado siguiente, y dichos conjugados deben ser estables en condiciones fisiológicas.

No deben presentar actividad anticoagulante. Deben ser capaces de resistir las condiciones físico-químicas y enzimáticas del tracto gastro intestinal, para garantizar así la actividad de los conjugados por vía oral; esta actividad viene originada a través de la interacción del conjugado con el tejido linfoide intestinal y la generación de una respuesta sistémica a través del puente de las células ãa T (AK Abbas, AH Lichtman, JS Pober "Cellular and molecular immunology" W.B. Saunders Co. Philadephia, pp 232-236 (1994). TW Mak, DA Ferrick "The ãa T-cell bridge: Linkage innate and adquired immunity" Nature Med. 4, 764-765 (1998)), puente que manifiesta un especial decaimiento en la vejez (G Pawelec, R Solana, E Remarque, E Mariani "Impact of aging on innate immunity" J. Leuk. Biol. 64, 703-712 (1998)).

25

30

B) Requisitos que deben cumplir las moléculas de naturaleza polipeptídica objeto de la presente invención:

Las moléculas de naturaleza polipeptidica objeto de la presente invención deben cumplir los siguientes paradigmas:

Deben ser capaces de resistir las condiciones físico-químicas y enzimáticas del tracto gastro intestinal, para garantizar así la actividad de los conjugados por vía oral.

Deben ser capaces de formar conjugados con polisacáridos con las características descritas en el apartado anterior, y dichos conjugados deben ser estables en condiciones fisiológicas.

Se consideran de particular interés aquellos polipéptidos estabilizados a través de puentes disulfuro o alternativamente estabilizados a través de manipulaciones químicas que conduzcan a la formación de puentes dimetileno.

Este tipo de estructuras presentan al mismo tiempo la estereoespecificidad propia de las polipéptidos con la estabilidad química propia de fármacos de bajo peso molecular.

Fuentes posibles de este tipo de moléculas son las polipéptidos de reserva de semillas vegetales, polipéptidos defensivos vegetales, polipéptidos edulcorantes vegetales, etc.

Para ello deben cumplir los siguientes requisitos:

.Peso molecular: Entre 4 y 30 KDa.

.Solubilidad: soluble en agua o en medios salinos, con fuerza iónica similares a las producidas por soluciones de cloruro sódico entre 0 y 0.25 M, a 15 concentraciones iguales o superiores a 0.1 mg/ml.

.En estado nativo deben ser resistentes a proteasas tipo tripsina, quimotripsina y/o pepsina, en las condiciones óptimas de trabajo de estas enzimas; en estado nativo deben ser resistentes a pH ácido (en condiciones similares a las del estómago), durante un tiempo no inferior a 1 hora.

- Deben ser capaces de resistir las condiciones físico-químicas y enzimáticas del tracto gastro intestinal, para garantizar así la actividad de los conjugados por vía oral; esta actividad viene originada a través de la interacción del conjugado con el tejido linfoide intestinal y la generación de una respuesta sistémica a través del puente de las células ãã T (AK Abbas, AH Lichtman, JS Pober "Cellular and molecular immunology" W.B. Saunders Co. Philadephia, pp 232-236 (1994). TW Mak, DA Ferrick "The ãã T-cell bridge: Linkage innate and adquired immunity" Nature Med. 4, 764-765 (1998)), puente que manifiesta un especial decaimiento en la vejez (G Pawelec, R Solana, E Remarque, E Mariani "Impact of aging on innate immunity" J. Leuk. Biol. 64, 703-712 (1998)).
- Cuando se desnaturalizan por agentes tales como cloruro de guanidina 8 M o urea 6 M y en presencia de agentes reductores de los puentes disulfuro, como ditiotreitol o â mercaptoetanol a concentración 6.4 mM, deben ser capaces de recuperar el estado nativo, evaluado a partir de los espectros de dicroismo circular en el rango 280-200 nm, por simple dilución de los agentes desnaturalizantes.

PCT/ES99/00338

14

.Preferentemente no glicosilados.

WO 00/50087

.Estabilizados por puentes disulfuro o dimetileno, pudiendo ser oligoméricos, especialmente diméricos, y en ese caso debe haber por lo menos dos puentes disulfuro o dimetileno intercatenarios.

5 .Secuencia: Para que se cumplan las condiciones anteriores, las polipéptidos objeto de la presente invención deben incluir en su secuencia la siguiente secuencia de consenso:

Z<sub>3-48</sub> C Z<sub>9-13</sub> C(Q,E,R,K)Z(Z<sub>hidrofóbico</sub>)(LIVM)Z<sub>15-39</sub> CC(Z<sub>hidrofílico</sub>)(Q,E,H)(L,V)Z<sub>6</sub> CZC Z<sub>2</sub> (L,I)Z<sub>13-56</sub> G Z<sub>15-26</sub> CZ(V,I,L,M)Z<sub>1-8</sub> CZ<sub>1-12</sub>

(() Indica 1 aminoácido, estando dentro del paréntesis los posibles por orden de preferencia. Zn indica n aminoácidos cualesquiera que sean. Esta secuencia tiene dominios CZnC (Tamaoki et al"Folding motifs induced and stabilized by distinct cystine frameworks" Protein engineering 11, 649-659 (1998))

En el caso de polipéptidos diméricos, la secuencia de consenso puede estar repartida entre las secuencias de las dos subunidades, lo que supone la existencia de un punto de hidrólisis, que debe estar en alguna de las zona indicadas por Z<sub>n</sub> de dicha secuencia.

Deben tener un efecto proliferativo significativo en un modelo de esplenocitos murinos (índice de proliferación 3 respecto al control). Se valora el efecto del tratamiento *in vitro* con los polipéptidos sobre células esplénicas de ratón Balb/c. El ensayo se realiza en microplaca y la proliferación se cuantifica por un método colorimétrico (T Mosmann "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytoxicity assays" J. Immunol. Methods 65, 55-63 (1983).

25

### C) Formación de los conjugados polisacárido polipéptido:

La formación de los conjugados polisacárido polipéptido es un fenómeno espontáneo a temperatura ambiente a partir de soluciones de ambos componentes en agua o soluciones salinas cuya fuerza iónica no exceda la equivalente a la de una solución de cloruro sódico 0.15 M. Los conjugados polisacárido polipéptido pueden estar en el rango 1/1 a 1/19 mol/mol. Los conjugados se forman mezclando a temperatura entre 15 y 40 °C y bajo agitación suave, entre 1 y 100 rpm, soluciones de polipéptido y de polisacárido que contengan la cantidad deseada de cada uno de ellos (de modo que se cumplan las relaciones mol/mol indicadas) y en los medios indicados. La mezcla de las

soluciones se mantiene bajo agitación un tiempo comprendido entre 5 y 60 minutos. Una vez formado el conjugado, éste puede ser administrado tal cual o en cualquier forma galénica adecuada, previa filtración esterilizante, en el caso de su uso por vía parenteral, intramuscular o subcutánea.

Es posible también formar conjugados entre un polisacárido y dos polipéptidos, siempre que se mantengan las proporciones polisacárido/total polipéptidos arriba indicadas, y se cumplan, además de las condiciones arriba indicadas, las siguientes condiciones:

- a) La razón entre los dos polipéptidos mol/mol esté entre 1/3 y 3/1.
- 10 b) Los dos polipéptidos sean del mismo origen biológico.
  - c) Los dos polipéptidos presenten una homología de secuencia no inferior al 25% (y que la suma de homología estricta y sustituciones permitidas no sean inferior al 50 %).

15

5

## D) Formas galénicas

Forma farmacéutica Inyectable: El conjugado se dializa o diafiltra contra una solución salina estéril apirógena y se esteriliza por filtración por 0.22 i en 20 condiciones estériles apirógenas.

Formas orales: El conjugado puede ser administrado en solución tal cual se obtiene o a partir de una solución extemporánea del conjugado liofilizado en agua, y también en cualquier forma galénica farmacéutica convencional, tales como tabletas, comprimidos o cápsulas, jarabes o cualquier forma farmacéutica líquida de uso oral, empleando los excipientes necesarios.

Formas farmacéuticas tópicas: El conjugado se puede formular en preparaciones tópicas en concentraciones entre el 1 y el 5 % (p/p) en formas convencionales como geles, cremas, pomadas, empleando los excipientes farmacéuticos habituales.

## Ejemplo 1.

## 1. Obtención del polisacárido.

Se obtiene, por ejemplo, basándose en los procedimientos descritos en G Kogan, J Sandula, V Simkovicova "Glucomannan from *Candida utilis*. Structural investigation" Folia Microbiol (Praha) 38, 219-224 (1993). KH Rademacher, Y Koch "(Structure of the cell wall mannans of synchronously multiplying *Candida utilis* cells)" Z. All. Mikrobiol 19, 65-67 (1979)), del siguiente modo:

En este ejemplo, el polisacárido, parte integrante del conjugado objeto de la presente invención, se obtiene a partir de *Candida utilis* desecada comercial para uso humano, por el método que a continuación se describe:

- 1.1.Pesar aproximadamente 100 g de semillas de soja. Ponerlas en remojo durante 24 horas en agua corriente.
- 15 1.2.Lavar las semillas varias veces.
  - 1.3.Molerlas en mortero o en picadora.
- 1.4.Preparar una solución acuosa de 2 L conteniendo 6.25 g/L de MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O y 3.33 g/L de CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O. Atemperar a 37 °C. Añadir, bajo agitación en agitador magnético, 0.21 g/L de MnO<sub>2</sub>, 62.5 g/L de *C. utilis* desecada y 12.5 g/L de la molienda de semillas.
  - 1.5.Incubar en agitador orbital a 37 °C y 200 rpm durante 48 horas.
  - 1.6.Dejar decantar, separar el sobrenadante y centrifugar a 2300 x g 10 minutos a temperatura ambiente. Filtrar el sobrenadante de la centrifugación por papel a vacío y por filtro de 0.45 ì.
- 25 1.7.Dializar contra 5 veces su volumen de agua MilliRO, durante 1 día a 4-8 °C, cambiando el agua entre 3 y 5 veces.
  - 1.8.En caso de que aparezca precipitado, eliminarlo por centrifugación a 2300 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente.
  - 1.9.Liofilizar, si se desea, los dializados o dializados centrifugados.
- 1.10.Purificar por métodos tradicionales, tales como cromatografía de permeación molecular (en geles tales como Sephacryl S-200 o S-400 o similares), ultrafiltración (por membranas de corte molecular 50.000 de Amicon o similares), etc.
  - 1.11.Si se desea puede liofilizarse.
- 35 1.12.Mediante este procedimiento se obtiene un producto puro en cantidades en

17

el rango entre 0.2 y 6.4 g polisacárido/100 g levadura, lo que posibilita su escalado industrial.

El polisacárido así obtenido tiene un peso molecular promedio de 5 150 KDa ± 30 KDa determinado por cromatografía líquida de alta eficacia de exclusión molecular en una columna TSK40, empleando como eluyente tampón fosfato 10 mM NaCl 0.3 M pH 7.4 y detección por índice de refracción, comparando con dextranos patrones de Fluka como estándares de peso molecular. Presenta un contenido en fosfato de 1 residuos de fosfato por cada 15 10 residuos de monosacárido, determinado según el método de Hess y Deer (HH Hess, JE Deer "Assay of inorganic and organic phosporous in the 0.1-5 nanomolrange." Anal Biochem 63:607-613 (1975)). Su composición en monosacáridos determinada por hidrólisis, reducción, acetilación y cromatografía de gases de los derivados acetilados de alditol (según los métodos descritos en 15 A Novotny "Basic exercises in Immunochemistry" S. Verlag Ed. Berlin, Heidelberg, New York pp. 127-131 (1979); G Keleti, WH Lederer "Handbook of Micromethods for the Biological Science" Ed. Van Nostrand Reinhold. New York. pp. 55-57. y HP Burchfield, EE Storrs "Biochemical Applications of Gas Chromatography" Academic Press. New York (1962)) es manosa 84 ± 6 %, 20 glucosa 7 ± 3 % y galactosa 1 ± 1 %. El análisis estructural determinado por degradación de Smith (F Smith, R Montgomery Meth Biochem Anal 3:153 (1956)) demuestra que dicho polisacárido presenta un esqueleto lineal 1-6, en el que se encuentran el 45 ± 5 % de los monosacáridos, con ramificaciones 1-2, en las que se encuentran el 45 ± 5 % de los monosacáridos. No da positivas reacciones de 25 carboxilato ni de sulfato. El polisacárido así obtenido interactúa con octadecilsilano cuando se inyecta en una columna de estas características en un medio acuoso (columna C18 Vydac) siendo necesario una concentración de al menos 25% de acetonitrilo para eluirlo. El polisacárido así obtenido no modifica ni su comportamiento cromatográfico en la columna TSK 40 anteriomente citada 30 ni su contenido en fosfato tras una incubación de 1 hora en jugo gástrico incompleto (2 g/L NaCl, 7 mL/L ácido clorhidrico concentrado) a 37 °C, baio agitación a 50 - 100 rpm. El polisacárido así obtenido no gelifica en presencia de cloruro cálcico a concentraciones inferiores a 10 mM. El polisacárido así obtenido no presenta actividad anticoagulante in vitro (TA Harper "Laboratory guide to 35 disordered haemostasis" pp 76-77 Butterworths (1970)).

18

## 2. Obtención del polipéptido.

Se obtiene, por ejemplo, basándose en los procedmientos descritos por FS Sharief, SSL Li "Aminoacid sequence of small and large subunits protein from *Ricinus communis*" J. Biol. Chem. 257, 14753-14759 (1982); J Godinho da Silva Jr, OLT Machado, C Izumi, JC Padovan, BT Chait, UA Mirzaa, LJ Geene "Aminoacid sequence of a new 2S albumin which is part of a 29-kDa precursor protein" Arch. Biochem. Biophys. 336, 10-18 (1996); GM Neumann, R Condron, GM Polya "Purification and sequencing of napin-like protein small and large subunits from *Momordica charantia* and *Ricinus communis* seeds and determination of sites phosphorylated by plant Ca <sup>2+</sup> - dependent protein kinase" Biochem. Biophys. Acta 1298, 223-240 (1996); MEH Bashir, I Hubatsch, HP Leinenbach, M Zeppezauer, RC Panzani, IH Hussein "Ric c1 and Ric c 3, the allergenic 2S albumin storage proteins of *Ricinus communis*: Complete primary structures and phylogenetic relationships" Int. Arch. Allergy Immunol. 115, 73-82 (1998) del siguiente modo:

En este ejemplo, el polipéptido, parte integrante del conjugado objeto de la presente invención, se obtiene a partir de semillas no germinadas de 20 *Ricinus communis*, por el método que a continuación se describe:

- 2.1. 100 g de semillas enteras, previamente lavadas con agua, se trituran hasta la obtención de una pasta no compacta.
- 2.2. La obtención del extracto se realiza agitando magnéticamente, la pasta con 25 500 ml de agua durante 18 h a 4°C.
  - 2.3. A continuación, los restos de semillas se eliminan por filtración sucesiva a través de filtro de malla de acero inoxidable de 0,2 mm de luz, capa de Hyflo supercell y por prefiltro de polipropileno y filtros de nitrocelulosa o similares de 40 mm de diámetro y luz de 80 ìm, 8 ìm, 5 ìm, 0,45 ìm y 0,22 ìm.
- 2.4. El filtrado se acidifica hasta pH 1.5 con ácido fosfórico diluido con agua MilliQ al 50 % (v/v).
  - 2.5. Se calienta a 56 °C en baño de agua con termostato durante 120 minutos, con agitación magnética suave.
- 2.6. Se centrifuga a 2300 x g durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se separa cuidadosamente el sobrenadante, de modo que no se contamine con el

precipitado.

- 2.7. Se neutraliza el sobrenadante con solución de NaOH al 20 % (p/v) hasta pH 7.0 - 7.5.
- 2.8. Se centrifuga a 2300 x g durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se 5 separa cuidadosamente el sobrenadante, de modo que no se contamine con el precipitado.
  - 2.9. Se ultrafiltra el sobrenadante por membrana de 5000 Da de corte molecular hasta aproximadamente 1/2 de su volumen. Se añadir agua MilliQ hasta volumen inicial y se ultrafiltra hasta 1/2 de su volumen. Se repite el proceso 4 veces.
- 10 2.10. El sobrenadante concentrado lavado resultante del paso anterior se cromatografía en columna de fase reversa (Vydac C4), purificando el polipéptido que eluye con una concentración de acetonitrilo entre el 18 y el 22 %.
  - 2.11. Se evapora el solvente por liofización y se elimina el exceso de sales por diafiltración o cromatografía en BioGel P10 o similar.
- 15 2.12. Si se desea puede liofilizarse.
  - 2.13. Mediante este procedimiento se obtiene un producto puro en cantidades en el rango entre 0.2 y 1.0 g polipéptido/ 100 g semilla de R. communis, lo que posibilita su escalado industrial.
- El polipéptido así obtenido tiene un peso molecular de 12 KDa ± 20 0.5 KDa, determinado por espectroscopía de masas, es dimérico, como se determina por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y reductoras (H Schägger, G von Jagow "Tricine-sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 KDa" Anal. Biochem. 166,368-379 (1987)), estando 25 dichos dímeros unidos por puentes disulfuro, cual puede deducirse de la necesidad de emplear condiciones reductoras para la resolución por electroforesis; es resistente a tripsina (incubada 24 horas a 37 °C en Tris-HCI 0.1M pH 8.5 en una relación polipéptido proteasa 30:1), pepsina (incubada 24
- horas a 37 °C en HCl 0.01M en una relación polipéptido proteasa 25:1) y cumple 30 el resto de las condiciones descritas en la Descripción General de la Invención. Su secuencia, determinada por degradación de Edman es la siguiente: Subunidad menor ESKGEREGSSSQQCRQEVQRKDLSSCERYLRQSSSRR Subunidad mayor

QQQESQQLQQCCNQVKQVRDECQCEAIKYIAEDQIQQGQLHGEESERVAQRA **3EIVSSCGWRCMRQTR** 

20

(están subrayados los aminoácidos especificados en la secuencia de consenso)

El polipéptido así obtenido induce *per se* la proliferación de las células esplénicas con un índice de proliferación máximo con un valor de 5 a la concentración de 3 µg/ml.

## 3. Formación del conjugado.

5

Se parte del polisacárido, obtenido como se indica en el punto 1 de este ejemplo, disuelto en agua a una concentración de 1 mg/mL, en un volumen total de 50 mL, y del polipéptido, obtenido como se indica en el punto 2 de este ejemplo, disuelto en agua a una concentración de 1 mg/mL, en un volumen total de 10 mL. Se vierte en un vaso y a temperatura ambiente 34 mL de la solución del polisacárido y 6.5 mL de la solución del polipéptido y se añade agua hasta un volumen final de 300 mL, se incorpora un imán y se agita a 50 rpm durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo se extraen alícuotas de 1 mL y se conserva congelado hasta su administración a los animales de experimentación.

# 4. Actividad biológica: Inhibición de la producción de factor de necrosis tumoral (TNF) inducido por endotoxina bacteriana (LPS) en suero de ratones Balb/c

El conjugado polisacárido-polipéptido se administra a ratones Balb/c por vía oral en un volumen de 0.5 mL de una solución preparada según se describe en el punto 3 durante seis días consecutivos previos a la inyección intravenosa de 25 µg por animal de endotoxina de *E. coli* serotipo 055:B5. El resultado que se obtiene con este tratamiento es una inhibición del 65% de los níveles de TNF sérico obtenido 90 minutos después de la administración de LPS.

Ninguno de los dos componentes del conjugado polisacáridopolipéptido administrados individualmente a dosis similares a las que se encuentran en el conjugado presenta actividad en este ensayo.

El TNF se determina mediante un bioensayo en el que se mide la 30 citotoxicidad del suero frente a la línea celular L929 (T Mosmann "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytoxicity assays" J. Immunol. Methods 65, 55-63 (1983).

## Ejemplo 2.

## 1. Obtención del polisacárido.

A partir de *C. utilis*, tal y como se describe en el Ejemplo 1, apartado 1.

## 2. Obtención de la polipéptido.

Se obtiene, por ejemplo, basándose en los procedmientos descritos por FS Sharief, SSL Li "Aminoacid sequence of small and large subunits protein from *Ricinus communis*" J. Biol. Chem. 257, 14753-14759 (1982); J Godinho da Silva Jr, OLT Machado, C Izumi, JC Padovan, BT Chait, UA Mirzaa, LJ Geene "Aminoacid sequence of a new 2S albumin which is part of a 29-kDa precursor protein" Arch. Biochem. Biophys. 336, 10-18 (1996); GM Neumann, R Condron, GM Polya "Purification and sequencing of napin-like protein small and large subunits from *Momordica charantia* and *Ricinus communis* seeds and determination of sites phosphorylated by plant Ca <sup>2+</sup> - dependent protein kinase" Biochem. Biophys. Acta 1298, 223-240 (1996); MEH Bashir, I Hubatsch, HP Leinenbach, M Zeppezauer, RC Panzani, IH Hussein "Ric c1 and Ric c3, the allergenic 2S albumin storage proteins of *Ricinus communis*: Complete primary structures and phylogenetic relationships" Int. Arch. Allergy Immunol. 115, 73-82 (1998) del siguiente modo:

En este ejemplo, el polipéptido, parte integrante del conjugado objeto de la presente invención, se obtiene a partir de semillas no germinadas de *Ricinus communis*, por el método que a continuación se describe:

- 2.1. 100 g de semillas enteras, previamente lavadas con agua, se trituran hasta 30 la obtención de una pasta no compacta.
  - 2.2. La obtención del extracto se realiza agitando, con agitador magnético, la pasta con 500 ml de agua durante 18 h a 4°C.
- 2.3. A continuación, los restos de semillas se eliminan por filtración sucesiva a través de filtro de malla de acero inoxidable de 0,2 mm de luz, capa de Hyflo
  supercell y por prefiltro de polipropileno y filtros de nitrocelulosa o similares de 40

mm de diámetro y luz de 80 ìm, 8 ìm, 5 ìm, 0,45 ìm y 0,22 ìm.

- 2.4. El filtrado se acidifica hasta pH 1.5 con ácido fosfórico diluido con agua MilliQ al 50 % (v/v).
- 2.5. Se calienta a 56 °C en baño de agua con termostato durante 120 minutos, 5 con agitación magnética suave.
  - 2.6. Se centrifuga a 2300 x g durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se separa cuidadosamente el sobrenadante, de modo que no se contamine con el precipitado.
- 2.7. Se neutraliza el sobrenadante con solución de NaOH al 20 % (p/v) hasta pH 10 7.0 7.5.
  - 2.8. Se centrifuga a 2300 x g durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se separa cuidadosamente el sobrenadante, de modo que no se contamine con el precipitado.
- 2.9. Se ultrafiltra el sobrenadante por membrana de 5000 Da de corte molecular
   15 hasta aproximadamente 1/2 de su volumen. Se añadir agua MilliQ hasta volumen inicial y se ultrafiltra hasta 1/2 de su volumen. Se repite el proceso 4 veces.
  - 2.10. El sobrenadante concentrado lavado resultante del paso anterior se cromatografía en columna de fase reversa (Vydac C4), purificando la polipéptido que eluye con una concentración de acetonitrilo entre 22 y 24%.
- 20 2.11. Se evapora el solvente por liofización y se elimina el exceso de sales por diafiltración o cromatografía en BioGel P10 o similar.
  - 2.12. Si se desea puede liofilizarse.
- 2.13. Mediante este procedimiento se obtiene un producto puro en cantidades en el rango entre 0.2 y 1.0 g polipéptido/ 100 g semilla de *R. communis*, lo que posibilita su escalado industrial.

El polipéptido así obtenido tiene un peso molecular de 11 KDa ± 0.5 KDa, determinado por espectroscopia de masas, es dimérico, como se determina por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y reductoras (H Schägger, G von Jagow "Tricine-sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 KDa" Anal. Biochem. 166,368-379 (1987)) estando dichos dímeros unidos por puentes disulfuro, cual puede deducirse de la necesidad de emplear condiciones reductoras para la resolución por electroforesis; es resistente a tripsina (incubada 24 horas a 37 °C en Tris-HCl 0.1M pH 8.5 en una relación polipéptido proteasa 30:1), pepsina (incubada 24

23

horas a 37 °C en HCl 0.01M en una relación polipéptido proteasa 25:1) y cumple el resto de las condiciones descritas en la Descripción General de la Invención. Su secuencia, determinada por degradación de Edman es la siguiente:

Subunidad menor PSQQGCRGQIQEQQNLRQCQEYIKQQVSGQGPRR

Subunidad mayor QERSLRG<u>CCDHL</u>KQMQSQ<u>CRC</u>EG<u>L</u>RQAIEQQQSQGQL Q<u>G</u>QDVFEAFRTAANLPSM<u>C</u>G<u>V</u>SPT<u>EC</u>RF

(están subrayados los aminoácidos especificados en la secuencia de consenso)

El polipéptido así obtenido induce *per se* la proliferación de las células esplénicas con un índice de proliferación máximo con un valor de 4 a la 10 concentración de 6 µg/ml.

# 3. Formación del conjugado.

Se parte del polisacárido, obtenido como se indica en el punto 1 del 15 ejemplo 1, disuelto en agua a una concentración de 1 mg/mL, en un volumen total de 50 mL. Se parte del polipéptido, obtenida como se indica en el punto 2 de este ejemplo, disuelta en agua a una concentración de 1 mg/mL, en un volumen total de 10 mL. Se vierten en un vaso y a temperatura ambiente 34 mL de la solución del polisacárido y 6.5 mL de la solución del polipéptido y se añade 20 agua hasta un volumen final de 300 mL, se añade un imán y se agita a 50 rpm durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo se extraen alícuotas de 1 mL y se conserva congelado hasta su administración a los animales de experimentación.

4. <u>Actividad biológica</u>: <u>Inhibición de la producción de factor de necrosis tumoral</u> 25 (TNF) inducido por endotoxina bacteriana (LPS) en suero de ratones Balb/c

El conjugado polisacárido-polipéptido se administra a ratones Balb/c por vía oral en un volumen de 0.5 mL de una solución preparada según se describe en el punto 3 durante seis días consecutivos previos a la inyección 30 intravenosa de 25 µg por animal de endotoxina de *E. coli* serotipo 055:B5. El resultado que se obtiene con este tratamiento es una inhibición del 55% de los níveles de TNF sérico obtenido 90 minutos después de la administración de LPS.

Ninguno de los dos componentes del conjugado polisacáridopolipéptido administrados individualmente a dosis similares a las que se 35 encuentran en el conjugado presenta actividad en este ensayo.

24

El TNF se determina mediante un bioensayo en el que se mide la citotoxicidad del suero frente a la línea celular L929 (T Mosmann "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytoxicity assays" J. Immunol. Methods 65, 55-63 (1983).

5

# Ejemplo 3.

# 1. Obtención del polisacárido.

A partir de *C. utilis*, tal y como se describe en el Ejemplo 1, apartado 1.

# 2. Obtención de las polipéptidos.

Se obtiene, por ejemplo, basándose en los procedmientos descritos por FS Sharief, SSL Li "Aminoacid sequence of small and large subunits protein from *Ricinus communis*" J. Biol. Chem. 257, 14753-14759 (1982); J Godinho da Silva Jr, OLT Machado, C Izumi, JC Padovan, BT Chait, UA Mirzaa, LJ Geene "Aminoacid sequence of a new 2S albumin which is part of a 29-kDa precursor protein" Arch. Biochem. Biophys. 336, 10-18 (1996); GM Neumann, R Condron, GM Polya "Purification and sequencing of napin-like protein small and large subunits from *Momordica charantia* and *Ricinus communis* seeds and determination of sites phosphorylated by plant Ca<sup>2+</sup> - dependent protein kinase" Biochem. Biophys. Acta 1298, 223-240 (1996); MEH Bashir, I Hubatsch, HP Leinenbach, M Zeppezauer, RC Panzani, IH Hussein "Ric c1 and Ric c3, the allergenic 2S albumin storage proteins of *Ricinus communis*: Complete primary structures and phylogenetic relationships" Int. Arch. Allergy Immunol. 115, 73-82 (1998) del siguiente modo:

En este ejemplo, los polipéptidos, parte integrante del conjugado objeto de la presente invención, se obtienen a partir de semillas no germinadas de *Ricinus communis*, por el método que a continuación se describe:

2.1. 100 g de semillas enteras, previamente lavadas con agua, se trituran hasta la obtención de una pasta no compacta.

- 2.2. La obtención del extracto se realiza agitando, con agitador magnético, la pasta con 500 mL de agua durante 18 h a 4°C.
- 2.3. A continuación, los restos de semillas se eliminan por filtración sucesiva a través de filtro de malla de acero inoxidable de 0,2 mm de luz, capa de Hyflo
- supercell y por prefiltro de polipropileno y filtros de nitrocelulosa o similares de 40 mm de diámetro y luz de 80 im, 8 im, 5 im, 0,45 im y 0,22 im.
  - 2.4. El filtrado se acidifica hasta pH 1.5 con ácido fosfórico diluido con agua MilliQ al 50 % (v/v).
- 2.5. Se calienta a 56 °C en baño de agua con termostato durante 120 minutos, 10 con agitación magnética suave.
  - 2.6. Se centrifuga a 2300 x g durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se separa cuidadosamente el sobrenadante, de modo que no se contamine con el precipitado.
- 2.7. Se neutraliza el sobrenadante con solución de NaOH al 20 % (p/v) hasta pH 15 7.0 7.5.
  - 2.8. Se centrifuga a 2300 x g durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se separa cuidadosamente el sobrenadante, de modo que no se contamine con el precipitado.
- 2.9. Se ultrafiltra el sobrenadante por membrana de 5000 Da de corte molecular
  hasta aproximadamente 1/2 de su volumen. Se añadir agua MilliQ hasta volumen inicial y se ultrafiltra hasta 1/2 de su volumen. Se repite el proceso 4 veces.
  - 2.10. A continuación se purifica por cromatografía de permeación molecular en BioGel P10, recogiendo la zona, con volumen de elución inferior al total, que da positiva para la reacción de Lowry (OH Lowry, HJ Rosenbrough, AL Farr, RJ
- 25 Randall "Protein measurement with the Folin phenol reagent." J.Biol. Chem. <u>193</u>, 265-275(1951)) y despreciando lo que eluye a un volumen igual o mayor que el total del lecho.
  - 2.11. Si se desea puede liofilizarse.
- 2.12. Mediante este procedimiento se obtiene una mezcla de los dos polipéptidos anteriormentes descritos (ejemplos 1 y 2), en proporciones polipéptido 1/ polipéptido 2 en el rango 35/75 a 75/35 y en cantidades en el rango entre 0.4 y 1.2 g de ambas polipéptidos/ 100 g semillas de *R. communis*, lo que posibilita su escalado industrial.

Los polipéptidos así obtenidos inducen, cuando se administran conjuntamente en la relación obtenida (2/1 polipéptido 12KDa/ polipéptido 11

26

KDa), per se la proliferación de las células esplénicas con un índice de proliferación máximo con un valor de 6 a la concentración de 3 μg/ml.

# 5 3. Formación del conjugado.

Se parte del polisacárido, obtenido como se indica en el punto 1 del ejemplo 1, disuelto en agua a una concentración de 3.75 mg/mL, en un volumen total de 150 mL. Se parte de los polipéptidos, obtenidas como se indica en el punto 2 de este ejemplo, disueltas en agua a una concentración de 0.75 mg/mL, en un volumen total de 150 mL. En un vaso y a temperatura ambiente se colocan ambas soluciones, se añade un imán y se agita a 50 rpm durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo se congela, liofiliza y se guarda congelado hasta su administración a los animales de experimentación, en que se disuelve en agua destilada a la concentración adecuada para la dosis requerida.

15

El espectro infrarrojo del glicoconjugado asi obtenido se muestra en la figura 1. Dicho espectro ha sido realizado en pastilla de bromuro de potasio, con una concentración del glicoconjugado del 0.2%, en un espectrofotómetro infrarrojo Perkin-Elmer modelo 881, barriendo desde 4000 a 600 cm<sup>-1</sup> en 6 minutos con rendija variable, resolución a 1000 cm<sup>-1</sup> y ruido espectral de 0.5% T y corregido electrónicamente por el procedimiento Savitzky/Golay y expandido automáticamente en absorbancia.

# 4. Actividad biológica.

25

35

Inhibición de la producción de factor de necrosis tumoral (TNF) inducido por endotoxina bacteriana (LPS) en suero de ratones Balb/c

El conjugado polisacárido-polipéptidos se administra a ratones 30 Balb/c por vía oral en un volumen de 0.5 mL a una dosis de 3 mg/Kg durante seis días consecutivos previos a la inyección intravenosa de 25 µg por animal de endotoxina de *E. coli* serotipo 055:B5. El resultado que se obtiene con este tratamiento es una inhibición del 65% de los níveles de TNF sérico obtenido 90 minutos después de la administración de LPS.

El TNF se determina mediante un bioensayo en el que se mide la

27

citotoxicidad del suero frente a la línea celular L929 (T Mosmann "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytoxicity assays" J. Immunol. Methods 65, 55-63 (1983).

5 <u>Efecto de diferentes dosis del conjugado polisacárido-polipéptidos sobre la producción de TNF inducido por LPS en suero de ratones</u>

Diferentes dosis del conjugado se administraron a los ratones con la misma pauta de tratamiento descrita anteriormente. El resultado indica que existe una relación dosis-efecto entre la inhibición del TNF y la dosis del conjugado. La curva dosis-efecto presenta forma de campana alcanzando un máximo de inhibición del 90% a la dosis de 48 mg/Kg.

Aumento de la actividad hematopoyética evaluada por el incremento en el número de células precursoras de la línea granulocito-macrófago (CFU-GM)

La administración intravenosa de una única dosis 2 mg/Kg en un volumen de 0.25 mL del conjugado polisacárido-polipéptidos a ratones C57Bl/6 induce la formación de precursores de la línea granulocito-macrófago medidos a los cinco días de su administración.

La administración intravenosa de los polipéptidos a dosis similar a la que presentan en el conjugado produce un incremento del 227% en el número de células precursoras CFU-GM. La administración individual por vía intravenosa del polisacárido a dosis equivalente a la que se encuentra en el conjugado no tuvo efecto en este ensayo. Cuando se administra el conjugado a la dosis descrita anteriormente la actividad aumenta hasta un 3763%.

Aumento de la supervivencia en ratones inmunosuprimidos e infectados con 30 Listeria monocytogenes

La administración de 3 mg/Kg del conjugado en un volumen de 0.5 mL por vía oral a ratones Swiss durante seis días consecutivos previos a la infección produce una protección en ratones inmunosuprimidos con sílice e 35 infectados con L. monocytogenes. La inmunosupresión es inducida por

28

tratamiento con 120 mg/Kg de sílice administrados intraperitonealmente un día antes de provocar la infección. La protección se manifestó como un incremento de la dosis letal 50, que en los animales tratados con el conjugado alcanzó un valor similar al de los animales no inmunosuprimidos.

5

# Restauración de la actividad citotóxica antitumoral de células NK de animales inmunocomprometidos

El tratamiento con 3 mg/Kg del conjugado en un volumen de 0.5 mL, durante cuatro días consecutivos aumenta la actividad NK en las células del bazo de ratones normales y la normaliza si está disminuida, como ocurre en el caso de ratones viejos y ratones inmunosuprimidos con ciclofosfamida a una dosis única de 180 mg/Kg.

15

# Efecto sobre la funcionalidad de macrófagos en ratón

El conjugado administrado en un volumen de 0.2 mL a una dosis de 0.9 mg/Kg a ratones Balb/c por vía oral durante seis días consecutivos incrementa la capacidad fagocitaria y bactericida de macrófagos peritoneales frente a *Staphilococcus aureus* con una clara relación entre la duración del tratamiento y los níveles de respuesta observados.

Cuando los macrófagos se enfrentan al patógeno intracelular 25 Candida guillermondi se observa un aumento tanto en el índice fagocitario como en la capacidad microbicida.

#### Acción sobre el edema pulmonar inducido por enddotoxina intranasal

Se indujo un edema pulmonar por instilación de 400 ½g de LPS de E. coli 055:B5 de Sigma, evaluándose el edema por inspección visual de la superficie pulmonar a los 3 días de la administración. La administración intraperitoneal del conjugado a distintas dosis (en el rango de 0.9 a 4.5 mg/Kg) en 0.5 mL de agua estéril apirógena diariamente desde el día de la 35 administración del LPS hasta el del sacrificio del animal, produce una

29

disminución clara de dicho edema, con una dosis eficaz 50 de 1.67 mg/Kg.

# Ensayo de toxicidad aquda en ratón

5

La administración oral a ratones de la cepa CD1 de una dosis de 200 mg/Kg en 1 mL del conjugado polisacárido-polipéptidos no resultó tóxica ya que no provocó mortalidad ni alteraciones en el peso corporal ni tampoco en el peso ni en el aspecto macro o microscópico de los principales órganos vitales.

10

# Acción sobre procesos de metabolización a nível hepático

El conjugado administrado por vía oral a la dosis de 3 mg/Kg en 0.5 mL a ratas Sprague-Dowley no interfiere en el aclaramiento de antipirina .

15 Administrado a una dosis tres veces superior en 0.5 mL por vía oral a ratas de la misma cepa durante seis días consecutivos no modifica el contenido en citocromo P450, citocromo b5 y NADPH citocromo c reductasa, no modifica tampoco actividades enzimáticas de biotransformación asociadas a citocromo P450 (Fase I), ni a enzimas de conjugación de fase II en microsomas hepáticos de rata.

0

#### REIVINDICACIONES

- 1.- Gliconcojugados constituidos por la asociación no covalente de polisacáridos con polipéptidos, caracterizados porque la fracción del polisacárido tiene un peso molecular entre 50 y 250 KDa, soportando grupos funcionales fosfato en el rango 1 de dichos grupos fosfato por entre 5 y 25 residuos de monosacárido, con un 40% de manosa y pudiendo ser los restantes glucosa y o galactosa, constituyente del esqueleto principal integrado por enlaces 1-6 con ramificaciones 1-2 no superiores al 60%; la fracción polipeptídica se caracteriza por comprender una secuencia de consenso determinada por Z<sub>3-48</sub>CZ<sub>9-13</sub> C(Q,E,R,K)Z(Z<sub>hidrofóbico</sub>)(LIVM)Z<sub>15-39</sub> CC(Z<sub>hidrofólico</sub>)(Q,E,H)(L,V)Z<sub>6</sub> CZC Z<sub>2</sub> (L,I)Z<sub>13-56</sub> G Z<sub>15-26</sub> CZ(V,I,L,M)Z<sub>1-8</sub> CZ<sub>1-12</sub>, donde los símbolos representan aminoácidos y los paréntesis indican el orden preferencial, y siendo Z<sub>n</sub> n-aminoácidos cualesquiera.
  - 2.- Glicoconjugados, según la reivindicación anterior, caracterizados por que la fracción polipeptídica puede estar constituida por uno o dos polipéptidos siempre que la razón entre los dos polipéptidos mol/mol esté entre 1/3 y 3/1.
- 3.- Glicoconjugados, según la reivindicación primera, caracterizados
   20 porque la fracción polipeptídica es un dímero de peso molecular 12 ± 0.5 KDa
   con las secuencias de aminoácidos seleccionadas entre:

#### Menor:

ESKGEREGSSSQQ<u>C</u>RQEVQRKDLSS<u>CE</u>RY<u>L</u>RQSSSRR 25 PSQQG<u>C</u>RGQIQEQQNLRQ<u>CQ</u>EY<u>I</u>KQQVSGQGPRR

Mayor:

QQQESQQLQQCCNQVKQVRDECQCEAIKYIAEDQIQQGQLHGEESERVAQRA

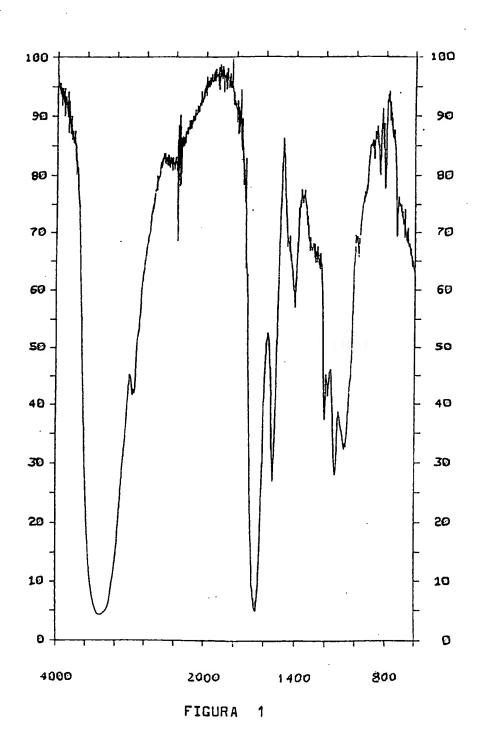
30 GEIVSSCGVRCMRQTR

QERSLRGCCDHLKQMQSQCRCEGLRQAIEQQQSQGQL

QGQDVFEAFRTAANLPSMCGVSPTECRF

y donde se señalan los aminoácidos específicos de la secuencia de consenso, 35 mediante subrayado.

- 4.- Glicoconjugados, según la reivindicación primera, caracterizados porque la fracción estructural polipeptídica se halla estabilizada por puentes disulfuro o dimetileno pudiendo ser oligomérica o preferentemente dimérica, y en este caso disponiendo al menos dos puentes intercaternarios de disulfuro o dimetileno.
  - 5.- Glicoconjugados, según la reivindicación primera, con actividad farmacológica y su aplicación en medicina para el tratamiento de desórdenes del sistema inmunológico.
- 6.- Glicoconjugados según la reivindicación primera y su aplicación en la farmacia para su uso en la preparación de formas galénicas usuales.



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/ES 99/00338

A. CLASS	IFICATION OF SUBJECT MATTER 6:			
IPC7: A61K 47/48, C07K 14/415				
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC				
B. FIELDS SEARCHED				
	ocumentation searched (classification system followed A61K. C07K	by classification symbols)		
Documental	tion searched other than minimum documentation to the	extent that such documents are include	d in the fields searched	
	ata base consulted during the international search (nam DOC, PAJ, CA, BIOSIS, WPIL	e of data base and, where practicable, so	earch terms used)	
C. DOCU	MENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category*	Citation of document, with indication, where appropri	ate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	
A	FR 2691465 A1 (P. FABRE MEDICAMENT) 2 The whole document	26 November 1993 (26.11.93)	1-6	
A	US 5284934 A (H.J.Allen, Jr.) 08 February 1994 (08.02.94) the whole document 1-6			
Furth	er documents are listed in the continuation of Box C.	X See patent famil	y annex.	
* Speci	Special categories of cited documents:     "T" later document published after the international filing date or			
	"A" document defining the general state of the art which is not consi-			
"E" earlie	"E" earlier document but published on or after the international filing  "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be			
date "L" docu	considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone and invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone.			
	is cited to establish the publication date of another citation or "Y" document of particular relevance; the ciamed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is com-			
	"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means being obvious to a person skilled in the art			
	ment published prior to the international filing date but later the priority date claimed	"&" document member of the same pater	t family	
Date of the a	ctual completion of the international search	Date of mailing of the international se	earch report	
	07 February 2000 (07.02.00)	17 February 2000 (17.02.00)		
	Name and mailing address of the ISA /	Authorized officer		
Facsimile 1	No. S.P.T.O	Telephone No.		

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No PCT/ ES 99/00338

Patent document cited in search report	Publication date	Patent familiy member(s)	Publication date
FR 2691465 A1	26.11.1993	NONE	
US 5284934 A	08.02.1994	NONE	
	***************		

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº PCT/ ES 99/00338

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD				
CIP <sup>7</sup> A61K 47/48, C07K 14/415 De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP.				
B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA				
Documentación mínima consultada (sistema de clasificación, seguido de los símbolos de clasificación)				
CIP <sup>7</sup> A61K, C07K				
Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda				
Bases de date términos de b	s electrónicas consultadas durante la búsque úsqueda utilizados)	da internacional (nombre de la bas	se de datos y, si es posible,	
EPODOC, PAJ, CA, BIOSIS, WPIL				
C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES				
Categoria*	Categoria* Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes Relevante para las reivindicaciones nº			
A	FR 2691465 A1 (P. FABRE MEDICAN documento	MENT) 26.11.1993, todo el	1-6	
A	US 5284934 A (H.J. Allen, Jr.) 08.02.19	994, todo el documento	1-6	
En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos  Los documentos de familia de patentes se indican en el anexo				
"A" documento como partic	especiales de documentos citados: que define el estado general de la técnica no considerado anarmente relevante.	pero que se cita por permitir la co constituye la base de la invención.	rtenece al estado de la técnica pertinente imprensión del principio o teoria que	
"L" documento prioridad o cita o por u "O" documento una exposi	patente o patente anterior pero publicada en la fecha de n internacional o en fecha posterior.  que puede plantear dudas sobre una reivindicación de que se cita para determinar la fecha de publicación de otra na razón especial (como la indicada).  que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a ción o a cualquier otro medio.  publicado antes de la fecha de presentación internacional	documento aisladamente considerado  "Y" documento particularmente relevante considerarse que implique una activi	na actividad inventiva por referencia al	
pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.  Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda  Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional				
internacional	internacional. 07 Febrero 2000 (07.02.2000)  Nombre y dirección postal de la Administración encargada  Funcionario autorizado			
de la busqued	a internacional O.E.P.M. 28071 Madrid, España.	M. NOVOA n° de teléfono + 34 91 3495552	SANJUR <b>J</b> O	

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional nº PCT/ ES 99/00338

	Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
	FR 2691465 A1	26.11.1993	NINGUNO	
-	US 5284934 A	08.02.1994	NINGUNO	





11 Publication number:

0 491 114 A1

(12)

# **EUROPEAN PATENT APPLICATION**

21 Application number: 91112217.4

② Date of filing: 22.07.91

(a) Int. Cl.<sup>5</sup>: **C12P 21/00**, C12N 1/38, C12N 1/06, C12N 5/00

Priority: 18.12.90 ES 9003173

② Date of publication of application: 24.06.92 BulletIn 92/26

Designated Contracting States:
DE FR GB IT

7) Applicant: LABORATORIOS ANDROMACO S.A.
Azcona 31
E-28028 Madrid(ES)

Applicant: CORLAY, S.A. Azcona 31

E-28028 Madrid(ES)

Inventor: Guerrero Gomez-Pamo, Antonio

Piaza Reyes Magos, 13 E-28007 Madrid(ES)

Inventor: De Lacy Boville, Rafael

Canoa, 8

E-28042 Madrid(ES)

Inventor: Matji Tuduri, José Antonio

Serra Magna, 8 E-28043 Madrid(ES)

Inventor: Pivel Ranieri, Juan Pablo

Gutemberg, 8 E-28014 Madrid(ES)

(A) Representative: Garcia Cabrerizo, Francisco OFICINA GARCIA CABRERIZO S.L. Vitruvio 23 E-28006 Madrid(ES)

- A process for preparing new non-covalent polysaccharide-protein associations having pharmacological activity.
- The present invention discloses a process for the preparation of non-covalent polysaccharide-protein associations having immunomodulating and haemapoietic restoring pharmacological activity. It is characterized in that those associations are prepared from the combinations selected from seeds or seed flours and dead yeasts or their dried extracts after an spontaneous fermentation/extraction process controlled in a specific medium, followed by a controlled chemical-enzymatic lysis and by a concentration process and further purification by adsorption or exhaustive dialysis and drying. Said associations in the adequate galenic forms are applied in the pharmaceutical industry the use being in human and animal medicine.

#### Field of the invention

The invention relates to a process for preparing non-coval nt polysaccharide-protein associations (hereinafter Ps-Pr NCA) and to their application in human and animal medicine in the different pharmaceutical forms thereof.

#### Background of the invention

The scientific and technical literature (Chihara et al., Cancer Res, 30, 2776, 1970; Chihara et al., Nature, 222, 687, 1969; Teukagoshi, Cancer Chemotherapy, 1, 251, 1974 and Kamei et al., Cancer Chemotherapy, 4, 166, 1977), describes the preparation and pharmacological properties of polysaccharides (Ps) isolated from cultures of certain fungi, yeasts and bacteria. Particularly important among other properties of interest are the anti-tumor, anti-viral, immunomodulating, hypocholesterolemic, hypolipidemic, hypoglucemic, reticulo-endothelial system activator, etc. activities.

The most immediate prior art to the present invention is ES 543.855, wherein there is described a process for preparing a nitrogenated polysaccharide (N-Ps), whereby the fermentation is produced by consecutive inoculation separated in time of two pure cultures of two different genera of bacteria, Zymomonas and Pediococcus. There then follows a lysis-hydrolysis process by chemical and enzymatic action, filtration and preparation of the pharmacologically active N-Ps adsorbate.

The known processes suffer from several drawbacks defined as those derived from the handling of pure microbial cultures, such as the need to use sterile media, pollution, conservation of the genetic integrity of the strains, as well as those derived from the limited biological potential of the single specifically inoculated microorganisms relative to the processing of the substrates. Unfavourable consequences of this are variability in the substrate conversion or in the biosynthesis of the products, which means lack of reproducibility in the yields and/or in the characteristics of the endproduct, which may not be corrected by the subsequent processes of fractioning and purification.

The present invention discloses a process free from the above drawbacks, since the process described is a "mixed culture", in accordance with the definition and having the corresponding advantages proposed by Hesseltine (C.W. Hesseltine -1983- Ann. Rev. Microbiol. 37, 575-601), consisting fundamentally of a spontaneous fermenting process, i.e. without pure inocula, the development of which is based essentially on the pressure of biological selection produced by a special culture medium, unique to the present invention, which causes the same natural microorganisms always to grow in the same time sequence, thereby defining a fermentation standard. And furthermore, this invention affords the advantage that said medium produces a fermentation standard and extraction characteristics such that the use of different precursors is made possible. These, processed always in the same way, lead to their corresponding active end products. The advantages may be summarized, therefore, as:

- 1. A process has been achieved allowing pure inocula of laboratory strains to be replaced by naturally occurring microorganisms, developed by selection pressure in "mixed culture", with the corresponding elimination of the risk of loss of the process by contamination or modification of the genetic features of the strains used.
- 2. A process has been achieved which, being a mixed culture of naturally occurring strains, allows different precursors both of the polysaccharide component and of the protein component of the different end products defined as Ps-Pr NCA to be processed. This versatility of the process of the present invention is not possible with processes based on pure inocula, capable of efficaciously modifying only their specific substrates. Thus, different new pharmacologically active Ps-Pr NCA are prepared.
- 3. Other purification processes of Ps-Pr NCA have been developed, allowing them to be used in other more effective galenic forms.

The Ps-Pr NCA have their own pharmacological properties allowing them to be applied in human and animal medicine.

#### Brief summary of the invention

45

50

55

The object of the invention is a process for preparing pharmacologically active non-covalent polysaccharide-protein associations (Ps-Pr NCA) consisting of:

a) preparing a culture medium by addition, und r stirring, to a particular volum of d ionized water, of metal oxides, divalent metal salts, bacteriostats, elementary sulphur and the precursors generating th protein fraction and th polysaccharid fraction. Th suspension, aft r homogenization, is h ld without stirring at a temperature ranging from 35° to 45°C, there being produced under thes conditions a

fermentation characterized by acidulation of the medium, which is maintained until a pH ranging from 3 to 5 is reached.

b) producing a controlled chemical and nzymatic hydrolysis at pH 1.0-2.8 and at a temperature of 35°-45°C by incorporating in the pr viously filt r d f rmentation medium a strong inorganic or organic acid (pKa 0.1-3.0), a chaotropic agent and a protease active in acid medium, to obtain as sole macromolecules in solution the components of the Ps-Pr NCA; and

c) purifying the Ps-Pr NCA by removing the low molecular weight contaminants by i) dialysis/exhaustive ultra- filtration processes using appropriate membranes, which supply the pure Ps-Pr NCA in true solution or ii) precipitation by addition over a water miscible organic solvent, in the presence of inorganic calcium salts, in insoluble absorbate form. Both processes provide products which are used for the preparation of the different pharmaceutical forms.

The precursors are empirically selected biological materials carrying the molecules which will produce those forming part of the end product, the Ps-Pr NCA. Said molecules form part of tissue or cell structures from which they are released to be extracted and modified. The protein fraction (Pr) generating precursors comprise a number of naturally occurring products, among which they are selected from one or several seeds, grains or nuts, such as rape seeds, groundnuts, castor beans, sunflower seeds, soya beans, rice, their delipified residual mixtures or meals. The polysaccharide (Ps) fraction generating precursors are dried dead yeasts, one being selected from among the genera Candida, Saccharomyces, Rhodotorula, Sporobolomyces, Hansenula, Pichia, or their dry extracts.

For the purposes of the present invention, any possible polysaccharide fraction precursor pair (hereinafter PR-Ps)/ protein fraction precursor or precursors (hereinafter PR(s)-Pr) may be used indifferently, from among those mentioned above. Each PR-Ps/PR(s)-Pr pair gives a corresponding pharmacologically active Ps-Pr NCA, after a fermenting process defined by the conditions of the medium and subsequent purification.

20

25

30

35

40

45

The object of the present invention is the preparation of pharmacologically active polysaccharide-protein associations of interest in human and animal medicine. To this end, there is described a process characterized by:

- A number of precursors of the protein fraction and of the polysaccharide fraction of the Ps-Pr NCA selected empirically on the basis of the biological activity of the corresponding end product and from which the molecules forming said fractions will be obtained.
- A fermentation/extraction medium characterized by the properties of controlling the fermentation process of the microorganisms provided naturally by their organic components and of extracting and modifying the molecules which will form the Ps-Pr NCA.
- Selective controlled chemical, physical and enzymatic conditions of hydrolysis for the purposes of hydrolyzing all the macromolecular components extracted except those which will form part of the pharmacologically active Ps-Pr NCA.
- Ps-Pr NCA purification processes by way of dialysis/ultrafiltration or the formation of an insoluble adsorbate producing the products which are used for the preparation of the different galenic forms.

The process of the present invention is characterized in that it comprises the following steps:

In a first step, a culture medium is prepared by the addition under stirring to a particular volume of deionized water, of metal oxides, such as manganese dioxide, manganese and cobalt salts, with the anions from hydrochloric or sulphuric acid, known bacteriostats such as camphor, elementary sulphur, and organic acids of the abietic group in their natural form of rosin (70% acid). After homogenization the suspension is held at a temperature ranging from 35° to 45°C.

In a second stage the Ps-Pr NCA precursors are prepared and added to the culture medium.

In a third step the fermentation medium is held at rest under a controlled temperature ranging from 35° to 45° C. On reaching a pH ranging from 3 to 5, the process is held for a further 4 to 13 days, after which this step of the process is considered to be terminated and a fourth step is performed in which the liquid filtrate of the fermentation process is treated with strong acids having a pKa of 0.1-3.0 such as hydrochloric, trichloroacetic, trifluoroacetic, phosphoric or sulphuric acid, to a pH ranging from 1 to 2.8, and chaotropic agents and lysing enzymes active in the pH range of 1-3, which may be selected from among pepsin, papain, chemopapain and bromelin, with incubation for 6 to 72 hours at a temperature ranging from 35° to 45° C. The Ps-Pr NCA is found in solution after the above described treatments.

Th fifth step of the process consists of concentrating the solution from the previous step. After filtration to clean the medium, tangential ultrafiltration is performed through membranes having a molecular cut-off of 10,000 to 50,000 daltons. In this way the volume is reduced to a final one ranging from 1/3 to 1/18 of the initial volume.

In the sixth step, the material may be alternatively purified by selective adsorption or by exhaustive

dialysis and subsequent evaporation to dryness or drying in the pres nc of salts:

Alt mativ (a): The purification by selective adsorption is effected by the addition of calcium chloride and adjusting the m dium pH followed by a chang of polarity by addition of a wat r miscible organic solvent such as than older or action, thereby separating the Ps-Pr NCA in the form of an insoluble adsorbate.

Alternative (b): The purification by exhaustive dialysis is effected by diafiltration of the solution from the fifth step against deionized water using membranes having a molecular cut-off of 10,000 to 50,000 daltons. Evaporation to dryness by lyophilization or spray drying produces the soluble form of the end product.

Alternative (c): Drying in a muffle, in the presence of inorganic stabilizing salts such as calcium suphates and phosphates produces the insoluble form, similar to the adsorbate.

In the seventh step, the products obtained in the previous step are processed to prepare the different galenic forms:

- Capsules, sachets or tablets are prepared from the insoluble inorganic salt stabilized forms (Alternatives (a) or (c)).
- Aqueous solutions with or without absorption promotors, suspensions, microemulsions, suppositories, injectables or topical preparations are prepared from the soluble forms (Alternative b).

The products prepared as described in the processes of Examples 1 to 4 show a number of pharmacological properties which are described below and which are the basis of the therapeutic use in human and animal medicine.

Reduction of the tumor necrosis factor (TNF) levels in serum of mice treated with bacterial endotoxin (LPS)

The product described in Example 1 was administered to Balb/c mice orally at a dose level of 150 mg/kg for 6 consecutive days, prior to intravenous challenge with 25 µg/animal of E. coli endotoxin serotype 055 B5. The result of the treatment with the product described in Example 1 leads to an inhibition of over 50% in the serum TNF levels obtained 90 minutes after the administration of LPS. Similar results were obtained in animals sensitized to the endotoxin with Zymosan or the Calmette-Guerin bacillus. The TNF determinations were made by measuring the cytotoxicity of the serum versus the cell line L929.

Reduction of the cholesterol level in hypercholesterolemic rats treated with Triton

The i.p. administration of Triton WR1239 dissolved in saline solution at dose levels of 500 mg/kg to Wistar rats induces hypercholesterolemia. When the product described in Example 1 was administered at a dose level of 500 mg/kg incorporated in the Triton solution, there was a reduction of the serum cholesterol levels of over 40% versus a control group. The serum cholesterol was determined 18 hours after i.p. administration of the products.

Increase of base corticosterone levels in mice

When the product described in Example 1 was administered orally to Balb/c mice at a dose level of 150 mg/kg, there was an increase of over 200% relative to the base corticosterone serum levels, measured by a radio-immunoanalysis 5 hours after product administration.

A similar result was obtained when the product described in Example 2 was administered via rectum at a dose level of 1,600 mg/kg.

Increase of the haematopoietic activity valued by the number of precursor cells (CFU-S and CFU-GM)

Intravenous administration of the product described in Example 3 to C57B1/6 rats at a dose level of 0.4 mg/kg produced an increase of over 150% in the number of spleen pluripotent cells (CFU-S) and 200% in the number of granulocite-macrophage line precursor spleen cells (CFU-GM), measured 5 days after administration versus a control.

Increase of the spleen haematopoietic activity valued by the increase in the number of pluripotent cells (CFU-S) aft r sublethal radiation

Oral administration of the product described in xampl 4 to C57B1/6 rats at a dose level of 150 mg/kg for six consecutiv days after a subl that radiation of 5.5-6.0 Gy produced an increase of 60% in the number of pluripotent spleen c IIs (CFU-S) versus the control.

10

15

Increas in survival of immunosuppr ssed mice inf cted with Listeria monocytogenes

Oral administration of th product described in Example 4 to Swiss mic at a dos 1 v 1 of 150 mg/kg for 6 days prior to infection produced protection in rats immunodepressed with silica and infect d with Listeria monocytogenes. The immunosuppression is induced by treatment with 120 mg/kg i.p. of silica 1 day before provoking infection. The protection is evidenced as an increase in the LD<sub>50</sub>, which in the treated animals reached a value similar to that of the non-immunosuppressed animals.

# Protective effect in mice subjected to lethal radiation

The product prepared according to Example 3 when administered in a single i.v. dose of 0.4 mg/kg<sup>-1</sup> to C57B1/6 mice one day before receiving a lethal radiation dose (7.75 Gy) produced a 100% survival rate valued 15 days thereafter.

The analytical profile of the different products prepared on operating up to step 6 inclusive of the processes described in Examples 1 to 4 is shown in Table I.

	TABLE			
	Example 1	Example	2 Example 3	Example
Organic matter % (w/w)	4.1-9.9	90-100	90-100	4.1-9.9
Polysaccharide fraction % (w/w) (1)	2.8-7.7	55-85	55-85	2.8-7.7
Protein fraction % (w/w) (2)	1.3-2.2	15-45	15-45	1.3-2.2
(1): Determined according to the method of Dubois (Dubois A. et al. Anal. Chem. 28, 350, 1956). (2): Determined according to the method of Lowry (Lowry O.H. et al., J. Biol. Chem. 193, 265, 1951).	Dubois (Dubois A.	et al. Anal. Chem. hem. 193, 265, 19	28, 350, 1956). (2): [ 51).	Jetermined
Polysaccharide fraction having a molecular weight ranging from 104 to 3 x 105, (formed by a heteropolysaccharide	weight ranging fror	n 10° to 3 × 105, (	formed by a heteropo	olysaccharide
(formed by mannose (70-90% w/w), glucose (5-20% w/w) and galactose (0-3% w/w), with 1-6 and/or 1-2, 1-3 or 1-4	e (5-20% w/w) and	galactose (0-3% v	//w), with 1-6 and/or 1	I-2, 1-3 or 1-4
bonds). Protein fraction having a molecular weight ranging from 10 $^4$ to 2 x 10 $^5$ .	weight ranging fron	n $10^4$ to $2 \times 10^5$ .		
The IR spectra (KBr) of the non-covalent Ps-Pr associations prepared according to Examples 1 to 4 are given in	s-Pr associations pr	epared according	to Examples 1 to 4 a	re given in
Figures 1 to 4 respectively.				

The infrared spectra of the non-coval nt polysaccharide-protein associations pr pared on operating the proc sses d scribed in Exampl s 1 to 4 ar shown in Figur s 1 to 4 r spectiv ly. Said spectra w r prepared with potasium bromid tablet, with a specimen concentration of 2% in a P rkin-Elm r mod I 881 infrared spectrophotometer, scanning from 4,000 to 600 cm<sup>-1</sup> in 6 minutes with a variable slot, resolution at 1,000 cm<sup>-1</sup> and spectral noise of 0.5% T. The spectra are shown electronically corrected by the Savitzky/Golay process and automatically expanded in absorbance.

#### Example 1

10

First step: Preparation of the culture medium.

From 0.2 to 0.4 g of manganese bioxide, from 5.2 to 7.1 g of manganese sulphate, from 2 to 5 g of rosin, from 2.4 to 4.2 g of cobalt chloride, from 4 to 6 g of camphor and from 4.5 to 6.5 g of sulphur precipitated in a 2 litre reactor were added to 1,000 ml of deionized water. The mixture was held at a temperature ranging from 35° to 45°C.

Second step: Preparation and addition of precursors.

From 5 to 25 g of soya beans, previously washed and soaked in water, were milled and added to the culture medium prepared in the previous step. Thereafter from 3 to 12 g of dead, dried <a href="Candida utilis">Candida utilis</a> were added.

Third step: Fermentation - extraction.

25

The fermentation mixture was held at rest at a temperature ranging from 35° to 45°C until the medium pH was between 3.0 and 5.0, the process being held for a further 4 to 13 days.

Fourth step: Chemical and enzymatic hydrolysis.

30

35

The reaction medium was filtered in Büchner funnel

through a layer of diatomaceous earth and 85% phosphoric acid was added to the filtrate to reach a pH between 1.0 and 2.8. Thereafter from 6 to 12 g of urea and from 0.1 to 0.6 g of pepsin was added. After homogenization, the mixture was held at rest for 6 to 72 hours at 35\*-45\*C.

\_\_\_\_\_\_

Fifth step: Concentration.

The reaction mixture from the previous step was filtered in a Büchner funnel through a layer of diatomaceous earth and concentrated by ultrafiltration through a polysulfone membrane having a molecular cut-off level of 10,000 to 50,000 daltons. Thus the volume was reduced to approximately 1/5 of the starting volume.

Sixth step, alternative a: Adsorbate.

From 10 to 25 g of anhydrous calcium chloride were added to the concentrate of the previous step, the pH being adjusted thereafter to 3.5-4.4 by the addition of 10% NaOH solution. This solution was poured over acetone, the final proportion of acetone being adjusted to 25 - 40% (volume/volume). The mixture was allowed to stand for 24 hours, and thereafter the major portion of the supernatant was decanted. The precipitate was filtered in a Büchner funnel, was washed exhaustively with an acetone/water mixture between 25 and 40% (volume/volume) and dried in an oven with air ventilation.

Seventh step: Galenic form.

Th product pr pared in th pr vious step was diluted with a mixtur of CaHPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O/CaSO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O 2/1 until the total sugar concentration m asured by the Dubois method was about 1.2-2.0% (w/w).

# Exampl 2

First step: Pr paration of the culture medium.

The cultur medium was id ntical to the one described in Example 1.

5 Second step: Preparation and addition of precursors.

Likewise from 5 to 25 g of soya beans, washed, soaked in water and ground were used. In this case the polysaccharide source was from 3 to 12 g of dead, dried Saccharomyces cerevisiae.

70 Third step: Fermentation-extraction.

The fermentation mixture was worked up in the same way as in Example 1.

Fourth step: Chemical and enzymatic hydrolysis.

The filtration, acidulation and hydrolysis were conducted identically to the method described in Example 1.

Fifth step: Concentration.

20

15

The filtered medium was concentrated by ultrafiltration under the same conditions as described for Example 1. The final volume is 1/5 of the starting volume.

Sixth step, alternative b: Soluble product.

25

The concentrate from the previous step was subjected to exhaustive dialysis by concentration cycles by ultrafiltration and addition of deionized water up to de original volume. The dialysis proceeded until the electric conductivity of the permeate had a value similar to that of the deionized water. The solution was then concentrated by ultrafiltration to a volume ranging from 1/6 to 1/10 of the original, and was finally lyophilized.

Seventh step: Galenic form.

Suppositories containing 0.125% (w/w) in Supocire BP, labrafil type excipient, were prepared from this lyophilized product.

#### Example 3

First step: Preparation of the culture medium.

Identical to the method described in Examples 1 and 2.

Second step: Preparation and addition of precursors.

A mixture of from 2.9 to 14.6 g of soya beans and from 2.1 to 10.4 g of castor beans, ground after being washed and soaked in water and from 3 to 12 g of dead, dried Candida utilis was used.

Third step: Fermentation-extraction.

The fermentation mixture was worked up in the same way as in Example 1.

50

Fourth step: Chemical and enzymatic hydrolysis.

Identical to that described for Examples 1 and 2.

55 Fifth st p: Concentration.

Conducted in the same way as discribed in Example 1, the solution being concentrated 6 times.

Sixth st p, alternative b: Soluble product.

Identical to that d scribed in Example 2.

5 Seventh step: Galenic form.

The product prepared in the previous step was dissolved extemporaneously for intravenous injection in saline serum solution.

#### 10 Example 4

First to fifth steps:

In the same way as Example 3, concentrated to 1/6 of the initial volume.

Sixth step, alternative a: Adsorbate.

The same as for Example 1.

20 Seventh step: Galenic form.

As described for Example 1.

#### Claims

25

30

35

15

- 1. A process for preparing new non-covalent polysaccharide-protein (Ps-Pr) associations, wherein:
  - a) one or several precursors of the protein fraction (Pr) selected from among oleaginous seeds, grains or nuts, and one or several precursors of the polysaccharide fraction (Ps) selected from among yeasts or extracts thereof, are reacted together at a temperature ranging from 35° to 45°C with a selective controlled extraction-fermentation aqueous medium, consisting of cobalt and manganese compounds, elementary sulphur, abietic acid or abietates and a bacteriostatic agent, the mixture being held at rest, with the absence of provoked bacterial inocula;
  - b) thereafter, the resulting Ps-Pr solution is subjected to a selective controlled chemical and enzymatic hydrolysis at pH 1.0-3.0 and at the same temperature, incorporating an acid having a pKa 0.1-2.0, a chaotropic agent and an enzyme selected from the group formed by pepsin, papain, chemopapain or bromelin; and
  - c) the Ps-Pr adsorbate is precipitated from the filtered concentrated liquors in the presence of salts, by adding a protic or aprotic water miscible organic solvent to the reaction medium, or by dialysisultrafiltration, to isolate the pure Ps-Pr association and prepare the different galenic forms.

40

- The process of claim 1, wherein the aqueous extraction-fermentation medium is prepared preferably with the following composition: metal oxides, from among which there are selected manganese dioxide at a concentration of 0.2 to 0.4 g L<sup>-1</sup>;
- 45 manganese and cobalt salts with anions from hydrochloric or sulphuric acid, at respective concentrations of 1.9 to 2.6 g L<sup>-1</sup> and 4.0 to 6.0 g L<sup>-1</sup>;
  - elementary sulphur, from 4.5 to 6.5 g  $L^{-1}$  and organic acids from the group formed by abietic acid in its natural form of rosin, preferably having a 70% acid content at a concentration of 2.0 to 5.0 g  $L^{-1}$ .

50

55

- 3. The process of claim 1, wherein from the naturally occurring precursor products generating the protein fraction, there are selected seeds, grains or nuts from the group formed by rape seed, groundnut, castor beans, sunflower seeds, soya beans, rice, the delipidated residues or meals thereof, and from the precursors g n rating th polysaccharid fraction th r are selected the dead dried yeasts or their dry raw xtracts from among the gen ra Candida, Saccharomyc s, Rhodotorula, Sporobolomyces, Hansenula, Pichia.
- 4. The process of claim 1, wherein the amount of pr cursor material added to the extraction-fermentation

medium is selected from among 5.0 to 25.0 g  $L^{-1}$  for the seeds and the equivalent in dry w ight for th meals, and 3.0 to 12.0 g  $L^{-1}$  for th precursor mat rial of th polysaccharide fraction.

- 5. The process of claim 1, wherein the extraction-f rmentation medium is held at a temperature of 35° to 45°C in the absence of stirring and at rest, the fermenting process being held for 4 to 13 days, with pH controlled to 3.0-5.0, to obtain a solution containing the molecules forming the non-covalent polysaccharide-protein association.
- 6. The process of claim 1, wherein the chemical and enzymatic hydrolysis is conducted by the addition to the filtered medium of:

an acid selected from the group formed by hydrochloric, phosphoric, sulphuric, trichloroacetic or trifluoromethanesulphonic acid to pH 1-2.8;

a chaotropic agent selected from urea at a concentration of 6.0 to 12.0 g L<sup>-1</sup>;

lysing enzymes selected from the group formed by papain, chemopapain, pepsin or bromelin, in an amount of 0.1 to 0.6 g L<sup>-1</sup>; the incubation proceeding for 6 to 72 hours at a temperature of 35° to 45°C.

20

- The process of claim 1, wherein the concentration of the liquids is conducted by membranes having a molecular cut-off ranging from 10,000 to 50,000 daltons.
- 8. The process of claim 1, wherein the non-covalent polysaccharide-protein association is purified in insoluble adsorbate form, when the acid used in the lysis is phosphoric acid, with calcium chloride being added to a final concentration of from 10.0 to 25.0 g L<sup>-1</sup>, sodium hydroxide in solution to pH ranging from 3.5 to 4.4 and a water miscible solvent such as ethanol or acetone to a final concentration ranging from 25 to 40% (w/w).
- 30 9. The process of claim 1, wherein the non-covalent polysaccharide-protein association is purified by exhaustive dialysis through membranes having molecular cut-off ranging from 10,000 to 50,000 daltons, and thereafter is isolated by evaporation to dryness, lyophilization, spray drying or concentration and drying in the presence of salts such as calcium sulphate and phosphate.
- 10. The process of claim 1, wherein the non-covalent polysaccharide-protein associations having immunomodulating and haemapoietic restoring pharmacological activity are administered in the galenic form selected for their use in human and animal medicine.
- 11. The process of claim 1, wherein a non-covalent polysaccharide-protein association is prepared depending on the combination of the selected protein fraction precursor or precursors and the selected polysaccharide fraction to obtain the desired, pharmacologically active association.
  - 12. The process of claim 1, wherein the Ps-Pr associations of:
- 45 Candida Soya

Candida - Castor

Candida - Soya: Castor

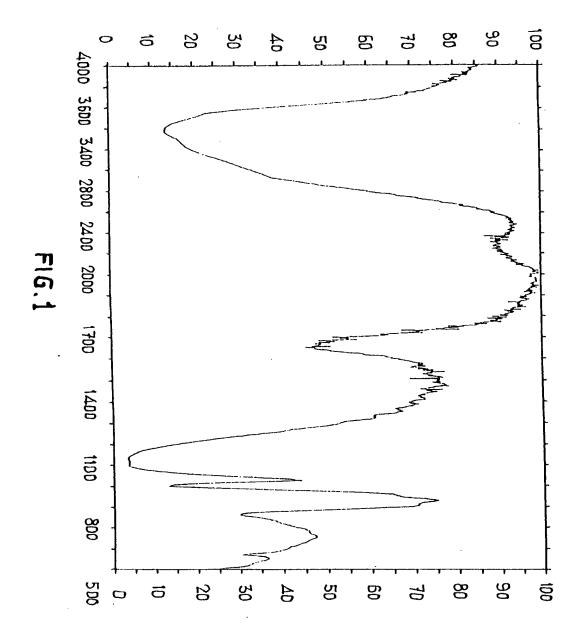
Saccharomyces - Soya

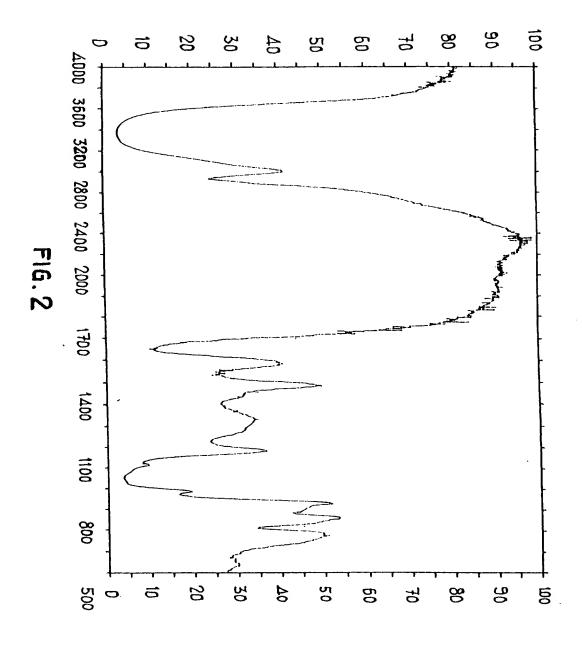
Saccharomyces - Castor

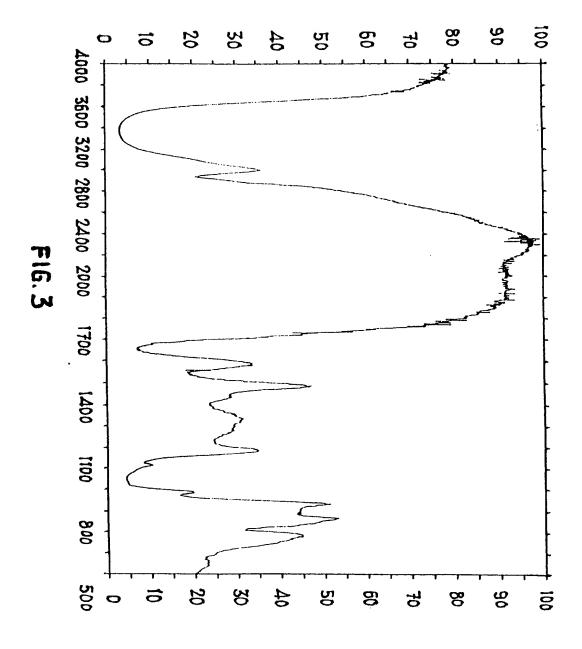
50 Saccharomyces - Castor: Soya

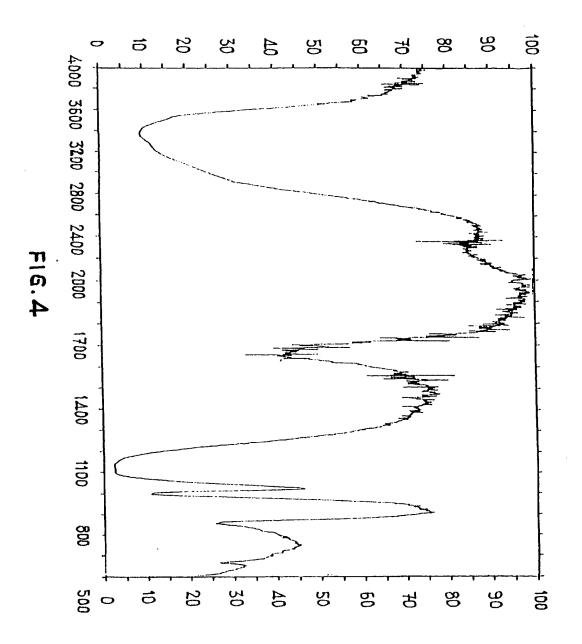
their adsorbates and mixtures with salts are selected.

55









# **EUROPEAN SEARCH REPORT**

Application Number

EP 91 11 2217

	DOCUMENTS CONST	DERED TO BE RELEVAN	T	
Category		dication, where appropriate,	Relevant to claim	CLASSIFICATION OF THE APPLICATION (Int. CL5)
<b>A</b>	FR-A-2 379 604 (LAVERNE "whole document, especi		1-12	C12P21/00 C12N1/38 C12N1/06
<b>A</b>	G8-A-2 025 768 (C. SEYL *whole document, especi 6-8*		1-12	C12N5/00
<b>A</b>	WO-A-8 904 599 (B. FORG *whole document, espect 15-16; claims 1-2,page	ally example 1, pages	1-12	
A D	FR-A-2 582 672 (CORLEY) *whole document* & ES-A-543 855	5 December 1986	1-12	
				TECHNICAL FIELDS SEARCHED (Int. Cl.5)
				C12P C12N
,				
	The present search report has b			
	Place of metch THE HAGUE	Date of completion of the search  D6 APRIL 1992	mas	Bundar turzo
Y:per do: A:tec : no	CATEGORY OF CITED DOCUME ritcularly relevant if taken alone ritcularly relevant if combined with an cument of the same category shaological background a-writtes disclosure armedizie document	NTS T: theory or princ E: earlier patent after the filing	fple underlying the comment, but put date it in the application for other reasons	e invention dished on, or a